



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**ESTUDO RETROSPECTIVO DE NEOSPORA CANINUM COMO CAUSA DE ABORTO
NUMA EXPLORAÇÃO DE BOVINOS DE LEITE DA REGIÃO DA MOITA DO RIBATEJO**

MÁRCIA CARINA SILVA FORTUNATO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luis Filipe Lopes da Costa

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutor George Thomas Stilwell

Dr. Dário Alexandre Nunes de Sá Guerreiro

ORIENTADOR

Dr. Dário Alexandre

Nunes de Sá Guerreiro

CO-ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**ESTUDO RETROSPECTIVO DE NEOSPORA CANINUM COMO CAUSA DE ABORTO
NUMA EXPLORAÇÃO DE BOVINOS DE LEITE DA REGIÃO DA MOITA DO RIBATEJO**

MÁRCIA CARINA SILVA FORTUNATO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luis Filipe Lopes da Costa

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutor George Thomas Stilwell

Dr. Dário Alexandre Nunes de Sá Guerreiro

ORIENTADOR

Dr. Dário Alexandre

Nunes de Sá Guerreiro

CO-ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2010

LISBOA

Agradecimentos

Desculpo-me desde já por todas as pessoas importantes que não referi, mas a tese é sobre neosporose e não sobre amizades (tenho a plena sensação de que poderia fazer uma dissertação sobre todas as pessoas que me acompanharam durante estes 6 anos). As palavras que escrevo serão sempre insuficientes para descrever tudo o que estas pessoas me deram, mas fica a ideia.

Aos meus pais por me ensinarem tudo o que sei, por me apoiarem o melhor que conseguiram, por me incutirem objectivos, e pelo esforço que empreenderam para permitir que eu estivesse onde estou hoje (ao meu pai por se ter virado do avesso para me ver formada, à minha mãe por me ensinar a amar os animais).

Ao Dr. Dário Guerreiro, orientador, pelo ensino, pela paciência e dedicação, pelo amor contagiante que tem por esta profissão e, principalmente, pela disponibilidade, amizade e diversão (e a não esquecer, pela orientação espiritual).

Ao Doutor George Stilwell pela paciência, disponibilidade, dedicação e orientação, fundamentais para a elaboração desta dissertação, assim como pelos conhecimentos transmitidos dentro e fora da sala de aula.

Ao Dr. Pedro Lima por ser tão boa pessoa e por tornar alguns dias de estágio ainda mais divertidos.

Ao Dr. João Jantaradas e à Dona Ana por fazerem com que as acções de ADS fossem sempre tão descontraídas (em especial à Dona Ana por ‘aquele’ autógrafo).

À minha afilhada por estar comigo desde sempre, por ter acompanhado tudo, desde a decisão até ao término desta odisseia veterinária, por estar sempre a meu lado, nos momentos fáceis e nos difíceis (existem pessoas que nos marcam para sempre).

Aos meus amigos, por me ajudarem a não ser só estudante.

À Joanhinha por me ter acompanhado de tão perto nestes últimos meses, por me ter mostrado que até terminar, ainda existem amizades que se podem estreitar e aprofundar, por me ter acompanhado nas descobertas e cansaço do estágio e nas neuras da tese (és a minha companheira de guerra). Obrigada, principalmente, pela amizade (e a não esquecer, que se não fosse por ti, ainda andava a brincar às teses).

À Catarina Lopes por estar comigo durante 6 anos, sem chatices, nem pressões, com uma amizade desprendida e saudável.

Ao Marcos, por toda a disponibilidade prestada e por me suportar há tanto tempo.

Ao Beto, por me ter acompanhado durante 5 anos.

Ao Luís por me aturar sempre com sorriso nos lábios, por me mostrar que não existe fim do mundo, por estar a meu lado e por tudo o resto.

À Catarina Silva, porque apesar de tudo, viveu comigo tantas aventuras, partilhámos tantos momentos de diversão e de profundidade, que nem os desentendimentos conseguem apagar.

À Joana Cuba por toda a disponibilidade prestada (prometo que ainda te pago ‘aquele’ lanche).

Aos meus colegas veterinários que tornaram a FMV num local melhor para se estar, com especial destaque para o Hélio Ferreira, João Dinis, Teresa Costa, Joana Fernandes, Ana Félix, João Barros, entre muitos outros.

Aos professores desta Casa, por me iniciarem nesta profissão magnífica e apaixonante.

À Cindy por me ter despertado este amor pelos animais.

Estudo retrospectivo de *Neospora caninum* como causa de aborto numa exploração de bovinos de leite da região da Moita do Ribatejo

Resumo

O aborto bovino representa perdas económicas e produtivas importantes. O seu diagnóstico é complexo e difícil, compreendendo causas infecciosas e não infecciosas.

A espécie *Neospora caninum* tem representado, desde a sua descoberta, em 1984, e a sua primeira caracterização, em 1988, uma importante causa de aborto bovino.

Em Portugal, o parasita foi identificado, pela primeira vez, em 2001. Desde então, têm sido realizados alguns estudos sobre a sua prevalência no país. Este agente, pela sua frequência e impacto nas explorações, deve ser incluído, sistematicamente, no diagnóstico diferencial de aborto bovino.

O presente estudo foi realizado numa exploração de bovinos de leite situada no centro de Portugal, na região da Moita. Os dados analisados corresponderam ao período compreendido entre os anos de 2007 a 2010, tendo sido registada uma alta taxa de aborto (39%), em 117 animais. Em 2008, a seroprevalência de neosporose era de 76%. Após a tomada de algumas medidas de controlo, esta percentagem diminuiu para 49%, em 2010. Neste estudo, foi apenas possível avaliar o intervalo entre partos. Nos animais seropositivos a *N. caninum* a média deste parâmetro correspondeu a 504 dias. Devido ao reduzido número de animais, não foi possível encontrar significância estatística entre os vários parâmetros analisados, no entanto, na bibliografia, o parasita é descrito como tendo um impacto profundo nos índices reprodutivos das explorações.

Palavras-chave: Bovinos leiteiros, Aborto infeccioso, *N. caninum*.

Retrospective study of *Neospora caninum* as a cause of bovine abortion in a dairy farm in Moita of Ribatejo

Abstract

Bovine abortion is responsible for important reproductive and productive economic losses. Its diagnosis is complex and difficult, covering infectious and non infectious causes.

Neospora caninum has represented, since its discovery in 1984, and its first characterization in 1988, an important cause of abortion.

In Portugal, the parasite was identified, for the first time, in 2001. Since then, some studies have been conducted concerning its prevalence in the country. This agent, by its frequency and impact in cattle farms, should be included, systematically, in diferencial diagnosis of bovine abortion.

The present study was conducted in a dairy cattle farm located in the centre of Portugal, in the region of Moita. The data analyzed corresponds to the period between the years of 2007 and 2010, during which a high abortion rate (39%) in 117 animals was registered. In 2008, the seroprevalence of neosporosis was 76%. After taking some control measures, this percentage decreased to 49% in 2010. In this study it was only possible to assess the calving interval. In animals seropositive to *N. caninum*, the mean calving interval was 504 days. Given the small number of animals, it wasn't possible to find statistical significance between the various parameters, however, in the bibliography, the parasite is described as having a profound impact on the reproductive efficiency of cattle farms.

Key words: Dairy cattle, Infectious abortion, *N. caninum*.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Nota introdutória	1
1.1.1. Descrição das Actividades	1
1.1.1.1. ADS	2
1.1.1.2. Clínica e cirurgia de ruminantes	2
1.1.1.3. Acompanhamento reprodutivo	4
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Gestação em bovinos	5
2.2. Morte embrionária e fetal	6
2.3. Aborto bovino.....	7
2.4. Impacto económico das perdas de gestação.....	9
2.5. Investigação de abortos e prognóstico.....	10
2.6. Causas infecciosas de aborto bovino.....	14
2.6.1. Brucelose	15
2.6.2. Campilobacteriose.....	17
2.6.3. Histophilose	19
2.6.4. Leptospirose.....	20
2.6.5. Listeriose.....	22
2.6.6. Salmonelose.....	24
2.6.7. Micoplasmose.....	25
2.6.8. Clamidiose	26
2.6.9. Bactérias oportunistas	28
2.6.10. BVD (Diarreia Bovina Viral)	29
2.6.11. IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina)	31

2.6.12. Infecção pelo vírus da Língua azul	32
2.6.14. Sarcocistose	34
2.6.15. Aborto micótico bovino	35
2.6.16. Neosporose bovina	36
2.6.16.1. Nota histórica	36
2.6.16.2. Agente etiológico e ciclo de vida	37
2.6.16.3. Prevalência	41
2.6.16.4. Impacto da Neosporose	42
2.6.16.5. Transmissão	43
2.6.16.6. Apresentação clínica	44
2.6.16.7. Lesões	46
2.6.16.8. Patogénese/relação parasita-hospedeiro	47
2.6.16.9. Factores de risco	50
2.6.16.9.1. Factores de risco de infecção	50
2.6.16.9.1.1. Idade dos animais	50
2.6.16.9.1.2. Presença de hospedeiros definitivos	51
2.6.16.9.1.3. Presença de outros carnívoros	51
2.6.16.9.1.4. Presença de outros hospedeiros intermediários	51
2.6.16.9.1.5. Pasto, forragem e água de bebida	52
2.6.16.9.1.6. Alimentação dos vitelos com leite ou colostro	52
2.6.16.9.1.7. Maneio dos partos	52
2.6.16.9.1.8. Densidade animal e tamanho das explorações	52
2.6.16.9.1.9. Fonte de novilhas de substituição	53
2.6.16.9.1.10. Clima	53
2.6.16.9.1.11. Índice de vegetação	53
2.6.16.9.1.12. Densidade populacional humana	53
2.6.16.9.1.13. Presença de anticorpos contra agentes de infecção	53

2.6.16.9.1.14. Raça.....	54
2.6.16.9.1.15. Alojamento.....	54
2.6.16.9.2. Factores de risco de aborto	54
2.6.16.9.2.1. Seropositividade individual	54
2.6.16.9.2.2. Seroprevalência nas explorações	55
2.6.16.9.2.3. Factores relacionados com o risco de infecção	55
2.6.16.9.2.4. Factores associados à reprodução.....	55
2.6.16.9.2.5. Participação nas feiras de gado.....	55
2.6.16.10. Diagnóstico.....	56
2.6.16.11. Controlo	57
2.6.16.12. Tratamento.....	60
3. Estudo de Caso.....	60
3.1. Objectivos.....	60
3.2. Materiais e métodos.....	60
3.2.1. Caracterização da exploração	60
3.2.2. Animais	62
3.2.3. Tratamento de dados	62
3.3. Resultados	63
3.4. Discussão	68
3.5. Conclusão	83
Bibliografia.....	84
Anexo I: Casuística total do estágio curricular	95

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Casuística mais frequente em bovinos de carne.....	3
Tabela 2 – Casuística mais frequente em bovinos de leite	3
Tabela 3 – Consequências reprodutivas da infecção pelo BVDV nas diferentes fases gestacionais	31
Tabela 4 – Médias e Desvios Padrão dos diferentes intervalos entre partos	67
Tabela 5 – Resultados das análises realizadas aos dois fetos em estudo.....	68

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Espécies animais assistidas em clínica de ambulatório	2
Gráfico 2 - Tipo de consulta prestada	4
Gráfico 3 - Percentagens de diagnóstico de fetopatias bovinas em 2008, no Reino Unido	15
Gráfico 4 - Representação dos trimestres de gestação em que ocorreram os abortos	63
Gráfico 5 - Representação da proporção de vacas que sofreram abortos repetidos	64
Gráfico 6 - Representação da distribuição da incidência abortos durante o período em estudo	64
Gráfico 7 - Representação da distribuição da incidência abortos durante o ano	65
Gráfico 8 - Representação da serologia realizada em 2008	66
Gráfico 9 - Representação da serologia realizada em 2010	66

Lista de Figuras

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>N. caninum</i>	41
---	----

Lista de Abreviaturas

ACTH – Hormona Libertadora de Corticotrofinas
ADS – Associação de Defesa Sanitária
AGID – Imunodifusão em Ágar-gel
BHV-1 - Herpesvírus Bovino Tipo 1
BRSV – Vírus Sincicial Respiratório Bovino
BVD – Diarreia Bovina Viral

BVD-MD – Diarreia Bovina Viral-Doença das Mucosas
CL – Corpo Lúteo
DAD – Deslocamento de Abomaso à Direita
DAE – Deslocamento de Abomaso à Esquerda
ELISA – *Enzyme-linked Immunoassays*
IA – Inseminação Artificial
IB – *Immunoblotting*
IBR – Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
IETS - *International Embryo Transfer Society*
IFAT – *Indirect Fluorescent Antibody Test*
IFN γ – Interferão Gamma
IFN- τ – Interferão Tau
IgG – Imunoglobulina G
IMS – Ingestão de Matéria Seca
KOH – Hidróxido de Potássio
LNIV – Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
P₄ – Progesterona
PAGs – Glicoproteínas Associadas à Gestação
PAS – Ácido Periódico de Schiff
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PGF_{2 α} – Prostaglandina F_{2 α}
PI – Persistentemente Infectado
RIT – Teste Imunocromatográfico Rápido
RT-PCR – *Real Time Polymerase Chain Reaction*
SNC – Sistema Nervoso Central
VBVD – Vírus da Diarreia Bovina Viral

1. Introdução

A performance reprodutiva representa uma questão central nas explorações bovinas actuais. As perdas embrionárias e os abortos têm um impacto profundo nesta performance, levando a importantes perdas produtivas e, consequentemente, económicas. Na presente dissertação, primeiramente, será sinteticamente apresentado um relatório de actividades de estágio. A revisão bibliográfica, apresentada em seguida, consiste, principalmente, na descrição da abordagem ao problema do aborto bovino, numa pequena descrição de alguns agentes infecciosos e numa exposição mais detalhada do parasita *N. caninum*. Esta revisão fornece a fundamentação teórica necessária à realização do estudo de caso, efectuado numa exploração de bovinos leiteiros localizada no centro do país.

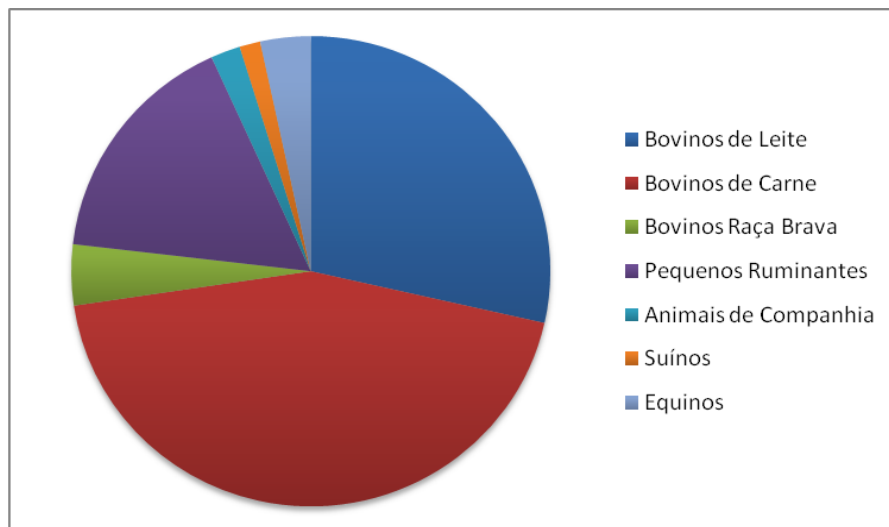
1.1. Nota introdutória

O Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa culmina com um estágio curricular, que permite integrar e aplicar à prática os conhecimentos adquiridos no decorrer de 5 anos de curso. Este estágio foi realizado durante cerca de 5 meses (iniciou-se no dia 15 de Setembro de 2009 e terminou no dia 15 de Fevereiro de 2010), compreendendo cerca de 1.100 horas. A área base foi a Moita do Ribatejo, abrangendo também algumas zonas da Península de Setúbal e Alto Alentejo. Este estágio compreendeu acções de sanidade animal, clínica de ambulatório e acompanhamento reprodutivo de explorações de bovinos, tendo sido orientado pelo Dr. Dário Guerreiro, Médico Veterinário.

1.1.1. Descrição das Actividades

O estágio não compreendeu somente a espécie bovina, tendo sido consultados, em clínica de ambulatório, pequenos ruminantes, suínos, equinos e animais de companhia. Como se pode observar no gráfico 1, os bovinos de carne representam a maioria dos animais consultados, sendo imediatamente procedidos pelos bovinos de leite.

Gráfico 1 – Espécies animais assistidas em clínica de ambulatório.



1.1.1.1. ADS

As acções de saneamento eram apenas efectuadas em bovinos (de leite, carne e raça brava), sendo o Dr. Dário Guerreiro o Médico Veterinário Executor da Brigada de Bovinos da Associação de Defesa Sanitária (ADS) da Península de Setúbal, com sede na Moita. Nestas acções era efectuada a tuberculinização dos animais adultos e a colheita de sangue para pesquisa de Brucelose, Leucose Bovina e Peripneumonia Contagiosa Bovina. Posteriormente, eram realizadas as verificações da reacção à tuberculinização. Além disso, eram realizadas também acções de pré-movimentação. Durante o período de estágio, foram saneados 4.405 animais.

1.1.1.2. Clínica e cirurgia de ruminantes

A clínica de ruminantes contabilizou a grande maioria das actividades de estágio. Na tabela 1 e 2 é apresentada a casuística mais frequente, em bovinos de carne e leite, respectivamente.

Tabela 1 - Casuística mais frequente em bovinos de carne.

Bovinos de Carne	
Situação	Frequência absoluta
Caquexia	10
Diarreia neonatal	33
Necrópsia	11
Parto	18
Patologia respiratória	35
Queratoconjuntivite	40

Tabela 2 – Casuística mais frequente em bovinos de leite.

Bovinos de Leite	
Situação	Frequência absoluta
DAE	10
Cetose	9
Diarreia neonatal	12
Mamite	8
Metrite	17
Parto	9
Patologia respiratória	25
Queratoconjuntivite	20

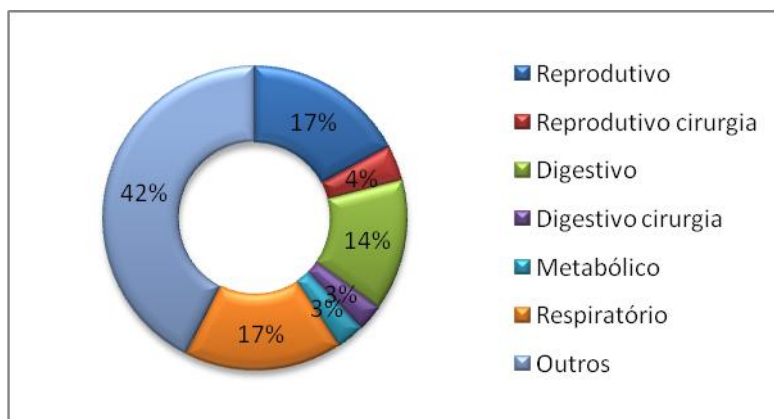
DAE: Deslocamento de Abomaso à Esquerda.

Na casuística apresentada, não foram contabilizadas as vacinações nem desparasitações realizadas aos vários animais. No total, foram contabilizadas 501 consultas realizadas nas várias espécies, tendo a espécie bovina representado 385 dessas chamadas. No gráfico 2, é possível constatar que as consultas realizadas por problemas reprodutivos, assim como por causas respiratórias, representam 17% das consultas prestadas, sendo essa percentagem apenas ultrapassada por consultas de natureza diversa (42%).

Durante o estágio, foi possível a observação de 33 cirurgias, 19 do foro reprodutivo e 14 do foro digestivo. Relativamente às cirurgias reprodutivas, foram realizadas 3 cesarianas (2 em bovinos de carne e 1 num bovino de leite) e 16 castrações (em bovinos, suínos, equinos e

animais de companhia). As cirurgias ao sistema digestivo compreenderam 12 cirurgias para resolução de deslocamento de abomaso, uma cirurgia intestinal e uma cirurgia ao ceco.

Gráfico 2 – Tipo de consulta prestada.



1.1.1.3. Acompanhamento reprodutivo

Durante o estágio, foi possível a participação no acompanhamento reprodutivo de 7 explorações leiteiras e 1 exploração de bovinos de carne. Pontualmente, eram realizados exames reprodutivos a outras explorações. Por norma, estes acompanhamentos eram realizados quinzenalmente, no entanto, em 4 das explorações leiteiras, a reprodução era feita também por outros veterinários, de modo alternado. As explorações acompanhadas apresentam dimensões médias, exceptuando uma, localizada em Elvas, que apresenta uma grande dimensão. O acompanhamento reprodutivo consistia no diagnóstico de gestação, realizado entre os 35 a 45 dias após inseminação (numa das explorações os dias deste diagnóstico eram mais abrangentes, pois era utilizada monta natural, estando o macho com as fêmeas durante todo o ano). Nos animais positivos ao diagnóstico, era realizado um novo exame aos 90 a 120 dias após inseminação, para confirmação da gestação. Aos 21 dias pós-parto, era realizado um exame reprodutivo para avaliar o estado da involução uterina, de actividade ovárica e de eventuais lesões palpáveis no tracto reprodutivo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Gestação em bovinos

A gestação é definida como o período decorrente entre o momento da fertilização e o parto. Nos bovinos, esta tem a duração de aproximadamente 280 dias (sendo possível uma variação entre os 270 e os 292 dias) (Stevenson, 2007). Segundo Barrett, Boyd e Mihm (2004), a gestação divide-se em três fases distintas: fase embrionária precoce, fase embrionária tardia e fase fetal.

Seguem-se algumas definições relevantes para melhor compreensão do texto desta dissertação. A terminologia utilizada é baseada nas recomendações do Comité de Nomenclatura Reprodutiva Bovina. O período embrionário estende-se desde a concepção até que se complete o estadio de diferenciação. Por sua vez, o período fetal inclui o período decorrente entre o final da diferenciação do conceito e o término da gestação, ou seja, até ao parto (Hubbert *et al*, 1972). Assim, a morte embrionária refere-se à perda do conceito durante o período embrionário, isto é, até ao dia 42 pós fertilização. Por aborto, entende-se a expulsão do conceito antes do tempo. A diferença entre nado-morto e aborto reside no facto de o primeiro ter terminado todo o seu desenvolvimento (Hubbert *et al*, 1972).

A progesterona (P_4) é a principal hormona da gestação, dependendo a continuidade da gestação dos seus níveis séricos. Num animal não gestante, os níveis de P_4 diminuem rapidamente ao 17º ou 18º dia do ciclo éstrico. Se ocorrer fertilização, os níveis desta hormona mantêm-se elevados durante toda a gestação (Stevenson, 2007). A presença de níveis consideráveis de P_4 , produzida pelo corpo lúteo (CL), inibe o retorno ao estro devido ao feedback negativo que provoca na hipófise anterior. Na ausência de gestação, ocorre luteólise, causada pela libertação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) a partir do útero, em intervalos de seis em seis horas. Isto é induzido pela secreção de ocitocina a partir do CL, pelo que cada episódio de libertação de $PGF_{2\alpha}$ é acompanhado por um de libertação de ocitocina. Sabe-se também que a sensibilidade do útero para a ocitocina é determinada pela concentração de receptores endometriais para esta hormona, pelo que a $PGF_{2\alpha}$ só actua se existirem previamente receptores uterinos para a ocitocina (Noakes, 2009). Quando uma fêmea se encontra gestante, o desenvolvimento dos receptores de ocitocina é inibido pelo interferão tau ($IFN-\tau$), produzido pelo trofoblasto do embrião (Robinson, Mann, Lamming & Wathes, 1999). Este interferão permite que ocorra o reconhecimento materno da gestação. Este reconhecimento ocorre entre o dia 14 e 17 após a fertilização [(Thatcher, 1995), citado por Inskip e Dailey (2005)], inibindo a secreção da $PGF_{2\alpha}$ e, portanto, evitando a luteólise

(Robinson *et al*, 1999). Durante esta fase é fundamental que o embrião seja viável, pois se não ocorrer este reconhecimento, ocorre luteólise, com consequente morte embrionária (Inskeep & Dailey, 2005).

2.2. Morte embrionária e fetal

O término da gestação pode ocorrer em qualquer dos estadios acima descritos. A morte embrionária precoce ocorre quando há uma falha no reconhecimento materno da gestação e, neste caso, o intervalo entre estros não é afectado, ou seja, o animal apresenta novo cio em menos de 25 dias após o seu último cio. Pelo contrário, na morte embrionária tardia, uma vez que este reconhecimento já ocorreu, os animais podem retornar ao cio apenas em 25 a 40 dias após o cio anterior (Jainudeen & Hafez, 2000; Barrett *et al*, 2004). Existe ainda a mortalidade fetal, que pode ser dividida em aborto (quando o feto é expelido) e em mumificação (quando o feto é retido no útero) (Jainudeen & Hafez, 2000).

A mortalidade embrionária precoce é relativamente mais frequente do que a tardia, devendo ser considerada como uma forma eficaz de eliminação de genótipos inadequados em cada geração, principalmente nas gestações múltiplas (Jainudeen & Hafez, 2000).

O período exacto de maior mortalidade embrionária nas explorações actuais de bovinos leiteiros não é conhecido, pelo que diferentes autores consideram períodos distintos. Segundo o estudo realizado por Sreenan e Diskin (1986), citado por Barrett *et al*. (2004), a maioria das mortes embrionárias ocorrem nas primeiras três semanas de gestação. Pelo contrário, Jainudeen e Hafez (2000) encurtam esse período, considerando que a grande maioria dessas mortes ocorrem entre o 8º e o 16º dia. Através do seu estudo, Sreenan, Diskin e Morris (2001), citado por Silke *et al*. (2002), concluíram que algumas perdas ocorrem poucos dias após a fertilização, e que 70-80% das perdas embrionárias ocorrem entre o dia 8 e 16. Apenas 10% destas perdas ocorrem entre o dia 16 e 42, e só 5 a 8% das perdas são devidas a morte fetal.

Barrett *et al*. (2004) descrevem vários factores como possíveis causas de mortalidade embrionária: temperaturas ambientais extremas (principalmente as temperaturas excessivamente altas), endometrites e metrites, infecções dos folículos, gâmetas e/ou embrião, ambiente endócrino materno, gâmetas envelhecidos, trauma local, factores genéticos, nutrição [(por exemplo, as vacas que perdem condição corporal entre o dia 28 e 56 de gestação apresentam uma maior percentagem de perdas por morte embrionária, relativamente às vacas que mantêm ou ganham condição corporal durante este período (Silke *et al*, 2002)], e

incompatibilidade feto-maternal (Barrett *et al*, 2004). Como acima referido, os níveis de P₄ são uma peça fundamental na morte embrionária, não só por si, mas também devido às alterações que os seus padrões provocam nos níveis de outras hormonas, níveis esses que influenciam a sobrevivência do embrião (Inskeep & Dailey, 2005). Uma vez que na vaca a fonte de P₄ durante a totalidade da gestação é o CL, a luteólise leva, inevitavelmente, ao término da gestação (Jainudeen & Hafez, 2000).

A intensiva selecção genética operada nos últimos anos para aumentar a produção leiteira, associada ao aumento da ingestão de matéria seca (IMS) levou a um aumento dos níveis de infertilidade nas explorações (Silke *et al*, 2002). Silke *et al*. (2002) concluíram que o nível de produção leiteira apenas afecta a mortalidade embrionária precoce. Isto acontece, provavelmente, devido ao facto da *clearance* de P₄ sistémica se encontrar aumentada nestes animais, pois estes apresentam um metabolismo bastante aumentado, comparativamente às vacas leiteiras de menor produção e mesmo às vacas de aptidão cárneas, o que pode comprometer a continuidade da gestação [O’Callaghan *et al*. (2001), citado por Silke *et al*, 2002].

As perdas embrionárias e fetais parecem ser mais elevadas em vacas de leite múltiparas do que em novilhas ou em vacas de raças de carne (Inskeep & Dailey, 2005).

2.3. Aborto bovino

Como já foi referido, entende-se como aborto a terminação da gestação com a expulsão do feto antes de este ser viável, isto é, antes dos 260 dias de gestação (Jainudeen & Hafez, 2000). Uma vez que nos bovinos o CL é necessário durante praticamente a totalidade da gestação, a lise deste, normalmente, leva ao término da gestação, com consequente aborto. No entanto, o contrário pode ocorrer, ou seja, a morte fetal pode ser responsável pela luteólise, ocorrendo expulsão de um feto autolisado (Caldow & Gray, 2004), devido ao atraso temporal existente entre a morte fetal e a luteólise (Troedsson, 2002). Esta é a situação mais comum em vacas, contrariamente ao que acontece, por exemplo, nas éguas, em que não há dependência do CL durante a totalidade da gestação, sendo normalmente expulso um feto pouco autolisado, pois a morte fetal leva a um rápido decréscimo das concentrações séricas de P₄ (Troedsson, 2002). Se o CL persistir após a morte fetal, ocorre mumificação, isto é, o feto fica retido no útero, ocorrendo absorção dos líquidos amniótico e alantóico, assim como da totalidade dos fluidos fetais. Quando ocorre mumificação não há invasão bacteriana do útero, pelo que a vaca não apresenta sinais de doença. Caso haja invasão, ocorre maceração. Neste caso, frequentemente,

os animais perdem condição corporal, apresentam corrimento vulvar mucopurulento (Caldow & Gray, 2004), sofrendo alterações endometriais (Troedsson, 2002). Quando ocorre stress fetal devido a anóxia, desenvolve-se uma resposta esteróide, necessária ao parto. Neste caso, é expelido um feto sem grandes alterações (Caldow & Gray, 2004).

Em muitos processos infecciosos responsáveis por abortos bovinos, a principal lesão presente é a placentite. Actualmente, sabe-se também, que a retenção placentária é uma sequela frequente de abortos ocorridos na segunda metade da gestação, embora as suas causas não estejam completamente esclarecidas (Caldow & Gray, 2004).

Os abortos podem ser não infecciosos ou infecciosos. Nas vacas, principalmente naquelas com aptidão leiteira, os abortos não infecciosos apresentam uma prevalência importante relativamente às outras espécies pecuárias, como os equinos e ovinos. Estes podem ocorrer devido a causas genéticas, hormonais e nutricionais. As causas genéticas e cromossomais, como foi referido anteriormente, causam morte embrionária, assim como anomalias fetais que levam ao aborto (Jainudeen & Hafez, 2000). São exemplo de causas genéticas o complexo de malformações vertebrais, que afecta as vacas *Holstein* puras (causado por um gene recessivo), e também a discondroplasia (Cabell, 2007). Também as gestações gemelares implicam uma diminuição do tempo de gestação e, muitas vezes, abortos (Caldow & Gray, 2004). Alguns fármacos, como os estrogéneos, a PGF_{2α} e os glucocorticóides, quando em doses suficientemente elevadas, levam ao término da gestação (Jainudeen & Hafez, 2000). As causas nutricionais conhecidas como abortivas são o excesso de proteína na dieta, assim como de nitrogénio não proteico, a deficiência em selénio ou iodo (Caldow & Gray, 2004) ou em vitamina A (Jainudeen & Hafez, 2000). A inanição e malnutrição também podem ser causas de perda de gestação (Jainudeen & Hafez, 2000). Algumas plantas, quando ingeridas, são também responsáveis por abortos em bovinos [*Pinus ponderosa* e *Astragalus* sp. (Jainudeen & Hafez, 2000; Caldow & Gray, 2004)]. As mortes devido a aflatoxinas e por intoxicação por nitratos também são muitas vezes precedidas por abortos, o que indica que o feto é mais sensível que a vaca aos tóxicos (Caldow & Gray, 2004). Jainudeen e Hafez (2000), sugerem também como causas de abortos as intoxicações por arsénico e por naftalenos clorados.

Existem ainda outras causas não infecciosas de aborto, como a inseminação de um útero gravídico, as alergias, a anafilaxia e o stress (por exemplo devido a transporte, cirurgia ou febre), sendo também relativamente comuns os abortos em novilhas que ficam gestantes imeditamente após a puberdade, e em vacas que são cobertas muito cedo no pós-parto (Jainudeen & Hafez, 2000).

2.4. Impacto económico das perdas de gestação

Apesar da erradicação da brucelose, em 1998, a percentagem de abortos no Reino Unido continua a rondar os 4%, tendo apenas em conta o número de abortos reportados ao Ministério da Agricultura (Blowey, 1999). Em certas explorações este número é bastante mais elevado, tornando-se ainda mais preocupante e evidente quando ocorre um grande número de abortos num curto período de tempo. É de conhecimento geral que, depois dos custos relacionados com a nutrição, a fertilidade é o factor com maior impacto na economia da exploração leiteira (Blowey, 1999), sendo a perda de gestação uma das maiores causas de decréscimo da fertilidade (Lee & Kim, 2007). Devido às mortes embrionárias e fetais, são alterados os padrões de produção de leite, ou seja, a produção diminui, é perdido material genético (Caldow & Gray, 2004), diminuem os lucros da venda dos vitelos e aumentam os custos com a aquisição de novilhas de substituição (Parkinson, 2009a). Relativamente às vacas de aptidão cárnica, é sabido que os vitelos, principalmente os machos, são a maior fonte de rendimento e sustentabilidade das explorações (Caldow & Gray, 2004). Esslemont (1992), realizou um estudo no Reino Unido onde calculou, tendo em conta os preços naquele ano de leite, alimentação, vitelos, novilhas de substituição e vacas refugadas, que o custo, por cada dia de intervalo entre partos além dos 360 dias, correspondia a £3,00. Cabell (2007), por sua vez, estimou que o custo de um único aborto numa exploração leiteira é de £630. Livingstone e Longbottom (2006) referem também que os prejuízos anuais por infertilidade e aborto nas explorações bovinas perfazem 250 milhões de euros no Reino Unido. Na Europa, as perdas económicas atribuídas ao aborto, diminuição dos índices de fertilidade e redução da produção leiteira e da qualidade do leite, levam a uma perda de 40.000 euros por ano (numa vacaria com um efectivo de 60 vacas adultas e 20 novilhas) (Livingstone & Longbottom, 2006). Estes valores, apesar de não se encontrarem actualizados nem se referirem à realidade portuguesa, permitem ter uma noção real da dimensão dos custos causados por abortos. É, no entanto, bastante complicado determinar a incidência de perdas de gestação e o seu impacto económico, pois as mortes embrionárias e os abortos que ocorrem numa fase inicial da gestação não são facilmente detectáveis, tal como a morte neonatal muitas vezes também não é imediatamente associada a processos que afectaram o feto (Caldow & Gray, 2004). Num estudo coreano (Lee & Kim, 2007), onde foram analisadas sete explorações leiteiras com vacas *Holstein*, desde o ano de 2000 até 2006, permitiu chegar a algumas conclusões acerca das perdas de gestação e do seu impacto económico:

- a incidência de perdas de gestação era maior no segundo trimestre de gestação;

- a incidência de endometrites é mais alta nas vacas que abortam no terceiro trimestre, relativamente às do primeiro e segundo trimestre;
- a taxa de refugo não era significativamente diferente consoante se tratavam de perdas de gestação no primeiro, segundo ou terceiro trimestres;
- em média, o intervalo entre partos foi 256 dias mais prolongado em vacas que abortaram (Lee & Kim, 2007).

A incidência de perdas de gestação considerada normal é bastante controversa, pois diferentes estudos apresentam diferentes perspectivas. Estas discrepâncias podem dever-se ao facto dos estudos se realizarem em diferentes zonas geográficas e com animais de genética diversa. Além disso, as definições e os métodos usados são diferentes de estudo para estudo. Relativamente às endometrites, os autores do artigo (Lee & Kim, 2007) consideram que os resultados obtidos podem dever-se ao facto de ocorrer maior incidência de retenção placentária e de existir um atraso na involução uterina nas vacas que abortam no terceiro trimestre de gestação. Estas endometrites também podem contribuir para o aumento da taxa de refugo e do número de dias em aberto. Neste artigo, as perdas económicas são calculadas tendo em conta o custo da nutrição (ou seja, é multiplicado o custo de nutrição por dia, por vaca, pelo número de dias de intervalo entre partos a mais que as vacas abortadas apresentam), a média de crescimento de bezerros, o trabalho de produção, os custos veterinários e as perdas por refugo.

Apesar de a percentagem de mortalidade embrionária precoce ser mais elevada que a mortalidade embrionária tardia, esta última tem maior impacto na exploração, pois as consequências económicas são bastante mais marcantes devido ao grande aumento que estas mortes provocam no intervalo entre partos (Silke *et al*, 2002).

2.5. Investigação de abortos e prognóstico

Caldow e Gray (2004) consideram necessário investigar cada aborto ocorrido na exploração, não só devido ao seu impacto económico, mas também porque um aborto observado pode significar um problema mais profundo não detectado. No entanto, isto nem sempre é possível devido aos custos de diagnóstico. Assim, os autores consideram que quando a incidência de abortos é superior a 3%, ou quando ocorrem vários abortos sucessivos num curto período de tempo, devem ser investigadas as suas causas, de modo a que se consiga controlar o problema (Caldow & Gray, 2004).

Segundo Troedsson (2002), devido à complexidade do problema, o diagnóstico definitivo da causa de aborto bovino só é conseguido em 20 a 40% dos casos, pois este é um problema que afecta a vaca, o feto e a placenta (a doença causadora do aborto pode atingir cada uma destas unidades individualmente ou em conjunto). Neste diagnóstico devem ser considerados os determinantes básicos da doença animal, ou seja, o agente patogénico, o ambiente e a susceptibilidade do hospedeiro à doença em questão (Troedsson, 2002). A abordagem ao problema do aborto deve ser sistemática e deve incluir a história, o exame clínico da vaca, o exame do feto e placenta, a colecta de amostras para análise em laboratório e a interpretação dos resultados (Caldow & Gray, 2004).

Através da informação contida na história pode ser conseguido um diagnóstico diferencial, o que permite seleccionar as análises a requisitar (Caldow & Gray, 2004). Esta deve incluir vários parâmetros, como o sistema de produção da exploração, o número de vacas existentes, a estrutura etária destas, as medidas de biossegurança, a proveniência das novilhas de substituição, o sistema de alimentação, as condições de armazenamento desta (Caldow & Gray, 2004), a existência de abortos anteriores e respectivo diagnóstico, os contactos dos animais com outros de explorações diferentes, possíveis causas de stress materno, possível acesso a toxinas e plantas tóxicas, a origem da água de abeberamento e a história individual da vaca (reprodutiva, médica e vacinal) (Troedsson, 2002). Se possível, devem também ser obtidas informações sobre a fertilidade da exploração, a incidência de retenção placentária e a presença de qualquer outro problema clínico que possa ser relevante para o caso (Caldow & Gray, 2004).

É imprescindível realizar o exame clínico materno, tanto para tratamento do próprio animal (caso seja necessário), como para excluir algumas doenças, como a salmonelose ou a mastite de Verão. Devem recolher-se amostras de sangue da vaca e, no caso de suspeita de salmonelose, devem também ser recolhidas as fezes do animal. Observar a condição corporal da vaca e de outras vacas em final de gestação existentes na exploração é importante, principalmente quando o problema central é a existência de um grande número de nados-mortos, pois se a maioria dos animais apresentarem uma condição corporal igual ou superior a 3,5, provavelmente, existe um problema de obesidade. Caso seja decidido não recorrer à serologia, pode ser benéfico guardar uma amostra de soro congelada, de modo a que se possa, caso seja necessário, realizar um estudo retrospectivo (Caldow & Gray, 2004). Nesta fase, devem também ser recolhidas amostras da vagina e/ou útero da vaca para cultura e citologia, sendo indicado fazer também palpação rectal e, se possível, ultrassonografia por via transrectal do sistema reprodutivo, assim como vaginoscopia. Idealmente, devem ser

recolhidas amostras sanguíneas de outras fêmeas existentes na exploração (as amostras devem constituir 10% da exploração, tendo como mínimo 10 amostras). Esta amostragem é importante, pois pode demonstrar a existência uma resposta imunológica a um agente infeccioso específico. Estes resultados devem ser interpretados cuidadosamente, e tendo em consideração a história vacinal dos animais. Os títulos de anticorpos da vaca que abortou podem ser comparados aos títulos de vacas não abortadas, e na mesma fase da lactação. Como é sabido, a presença de anticorpos não indica necessariamente que o agente foi o responsável pelo aborto, no entanto, um aumento de quatro vezes nos títulos entre a doença aguda e a convalescência, sugere exposição recente ao agente. Em certas doenças, como a brucelose e a leptospirose, a serologia permite, por si só, fazer o diagnóstico definitivo (Troedsson, 2002). O exame do feto deve iniciar-se com a medição do seu comprimento, de modo a que se possa ter uma ideia da idade gestacional deste (Caldow & Gray, 2004). Isto é conseguido segundo a fórmula:

$$\text{Idade gestacional} = 2,5 \times (\text{comprimento do feto} + 21)$$

A idade gestacional é assim obtida em dias (o comprimento do feto é medido em centímetros, desde a coroa da cabeça até ao ânus) (Blowey, 1999; Caldow & Gray, 2004). É também importante pesar a carcaça, principalmente se se tratar de um nado-morto, pois permite explorar a possibilidade de distócia por desproporção feto-materna e comparar este peso com o peso da tiróide, essencial no diagnóstico de hipertiroidismo (Caldow & Gray, 2004).

A presença de placas brancas na pele, ou seja, hifas, indica envolvimento de fungos.

Quando ocorre anóxia fetal, o mecónio está presente no períneo, vias aéreas superiores ou estômago do feto. A anóxia pode ocorrer por placentite ou em partos distócicos. Em caso de distócia, pode também ser observada hemartrose das articulações do ombro ou quadril.

A necrópsia fetal permite, muitas vezes, a observação de variadas lesões, como pericardite, pleuresia, pneumonia ou hepatite, no entanto, estas não são específicas (Caldow & Gray, 2004). Deve também ser avaliado o grau de autólise do feto, assim como a presença de certas anomalias, como por exemplo, hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, fissura do palato, malformações cardíacas, entre outras (Troedsson, 2002).

Quando possível, a placenta deve ser cuidadosamente examinada, quanto ao tamanho, peso, grau de autólise e integridade (Troedsson, 2002). Frequentemente, este órgão apresenta espessamento intercotiledonar, necrose cotiledonar e neoplacentação (esta última lesão desenvolve-se como resposta crónica a uma placentação insuficiente, por exemplo, devido a placentite) (Caldow & Gray, 2004).

Idealmente, o feto abortado, conjuntamente com as membranas fetais, seriam directamente enviados para o laboratório veterinário. Como nem sempre isto é exequível, devem ser cuidadosamente seleccionadas algumas amostras para recolha (Caldow & Gray, 2004). As amostras requeridas e a sua preservação devem ser determinadas pelas causas de aborto bovino mais frequentes na área geográfica em questão, assim como pelas disponibilidades de diagnóstico do laboratório veterinário. No entanto, existem algumas directrizes: amostras histopatológicas devem ser submersas em formol a 10%, amostras para cultura bacteriana, isolamento viral e testes de imunofluorescência devem ser enviadas em gelo, no interior de recipientes estéreis. O conteúdo estomacal do feto constitui a amostra essencial para bacteriologia, embora idealmente se devam recolher amostras de tecido abomasal. Se possível, incluir também amostras de fígado e pulmões fetais. Deve ser recolhido um cotilédone representativo das lesões (enviar fresco). À placenta, devem ser realizadas análises histológicas, esfregaços por aposição, culturas bacterianas, isolamentos virais e testes de imunofluorescência (Troedsson, 2002). O sangue ou os fluidos fetais podem ser recolhidos de qualquer cavidade. Estas amostras representam uma elevada importância no diagnóstico de BVD (Diarreia Bovina Viral), neosporose e leptospirose. A tiróide, o baço, o rim e o cérebro fetais também podem ser usados para isolamento viral de BVD. Pelo contrário, para pesquisa de BHV-1 (Herpesvírus bovino, serótipo 1), a placenta é a amostra de eleição (Caldow & Gray, 2004). As análises histopatológicas são particularmente importantes na pesquisa de *Neospora caninum* e BVD, embora também sejam valorizadas na confirmação de hipertiroidismo. Os tecidos fetais que devem ser recolhidos para estas análises são o cérebro, pulmão, fígado, tiróide (em nados-mortos) e um cotilédone (estes tecidos não devem ser congelados) (Caldow & Gray, 2004).

É de salientar que um feto abortado no final da gestação é imunocompetente, pelo que títulos de anticorpos elevados podem ser indicativos de uma causa infecciosa. Os testes serológicos podem assim indicar uma resposta fetal activa não específica, pela medição de IgG, ou específica (Troedsson, 2002). Caso o animal sobreviva durante um curto período de tempo, é necessário ter em consideração, a possibilidade deste ter ingerido colostro e de os anticorpos maternos terem sido já absorvidos, o que irá alterar os seus títulos (Caldow & Gray, 2004).

Em conclusão, as amostras mínimas necessárias para diagnóstico de causas de aborto bovino são o conteúdo abomasal e o sangue ou soro fetais. Se os abortos continuarem a ocorrer e ainda não tiver sido possível alcançar um diagnóstico definitivo, devem ser recolhidas mais amostras e realizadas mais análises (Caldow & Gray, 2004).

Caso os fetos abortados e a placenta não sejam enviados para laboratório, devem ser queimados ou enterrados. As vacas que abortaram devem ser isoladas das restantes, para evitar o contágio de outros animais (Troedsson, 2002).

Saber fazer uma boa interpretação dos resultados é fundamental. Assim, a presença de anticorpos fetais para BVD ou *Neospora caninum* indica infecção fetal, no entanto, esta pode não ter sido letal, especialmente nas gestações mais adiantadas. Do mesmo modo, o isolamento de bactérias ou fungos da placenta não tem valor de diagnóstico se não forem realizadas análises histopatológicas, pois podem ser resultado da contaminação ambiental. Não deve ser feito um diagnóstico definitivo apenas tendo como base a serologia materna pois, na maioria das infecções, a infecção maternal precede o aborto. A maioria das infecções são endémicas e os anticorpos circulantes podem persistir durante longos períodos de tempo, pelo que os títulos de anticorpos maternos apenas indicam que o animal foi exposto ao agente. No caso da leptospirose, uma vez que a resposta da IgM é transitória, a vaca pode apresentar seronegatividade aquando da recolha de sangue. Assim, a serologia materna tem maior importância para exclusão de infecção do que para a realização de um diagnóstico definitivo. É também necessário ter em conta que, muitas vezes, num surto de abortos, estão envolvidos vários agentes, sendo necessário analisar cuidadosamente os resultados, tendo em conta o efeito potencializador da presença de vários agentes patogénicos (Caldow & Gray, 2004).

Caso a vaca não apresente sinais de doença sistémica ou de infecção uterina, o seu prognóstico, normalmente, é favorável. Depois de abortar, a vaca começa rapidamente a ciclar e, geralmente, as taxas de gestação são bastante satisfatórias. Quando ocorre um aborto na exploração, é necessário acompanhar de perto as restantes vacas gestantes, principalmente quando se trata de uma doença infecto-contagiosa (Caldow & Gray, 2004).

2.6. Causas infecciosas de aborto bovino

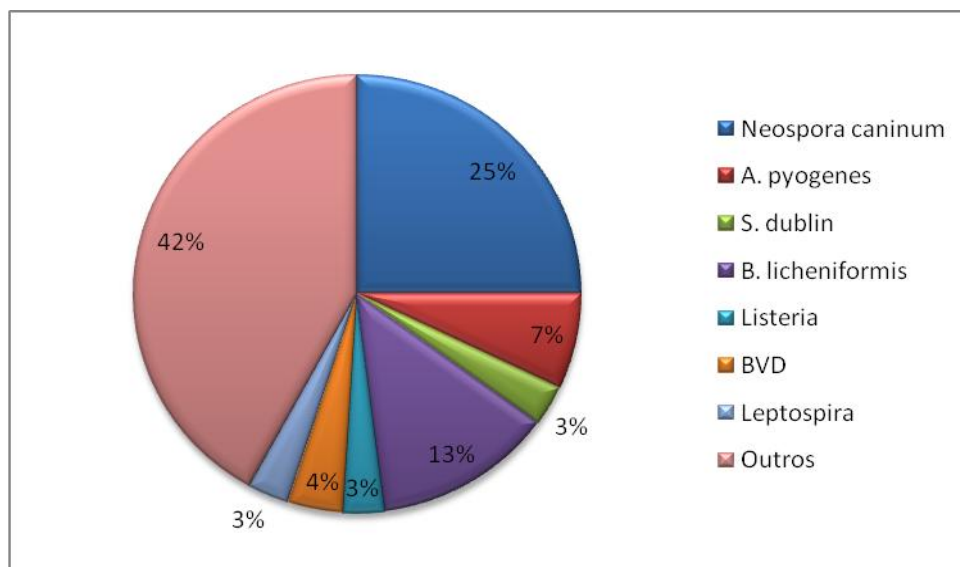
Os agentes infecciosos podem causar aborto através de diferentes modos de actuação:

- efeitos directos sobre o embrião/feto (inclui as infecções que causam morte embrionária precoce e abortos por infecção directa do feto ou placenta, podendo também levar ao nascimento de nados-mortos ou vitelos fracos);
- efeitos indirectos que afectam a sobrevivência do embrião (inclui os agentes patogénicos causadores de alterações na função uterina e na componente maternal da placenta; podem levar à morte embrionária, aborto, mumificação ou a nados-mortos);

- doenças maternas sistémicas que levam a abortos, como a febre (Parkinson, 2009b). Um exemplo de doença materna sistémica responsável pelo aborto bovino é a mastite aguda por coliformes. Como é sabido, a endotoxémia provoca um aumento da síntese de prostaglandinas, o que poderá conduzir ao aborto; também a coagulação intravascular pode ser induzida, o que altera a circulação placentária, resultando em hipóxia fetal. As pneumonias, pericardites traumáticas, a desidratação e a acidose levam também à hipóxia fetal (Cabell, 2007).

Na maioria dos abortos infecciosos, os agentes identificados são bacterianos (Gráfico 1). É sabido que se as bactérias conseguirem entrar na corrente sanguínea maternal e atingir a unidade fetoplacentária, podem causar abortos. Isto é possível pelo facto do feto ser bastante susceptível a uma grande variedade de microorganismos, pois o seu sistema imunitário é ainda muito imaturo. Também a supressão imunitária existente na junção da placenta materna com a fetal facilita o desenvolvimento dos agentes infecciosos (Yaeger & Holler, 2007).

Gráfico 3 - Percentagens de diagnóstico de fetopatias bovinas em 2008, no Reino Unido (n=1198). Adaptado de Veterinary Investigation Diagnosis Analysis (2008).



2.6.1. Brucelose

Esta é uma doença com elevada importância em termos de saúde pública, pois trata-se de uma zoonose (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007a).

Geralmente, o agente responsável pela brucelose bovina é a *Brucella abortus*, no entanto, a *B. melitensis*, que afecta maioritariamente pequenos ruminantes, também pode ser transmitida a

bovinos (Parkinson, 2009b). A *B. abortus* é um cocobacilo gram negativo, intracelular facultativo, que consegue sobreviver e multiplicar-se dentro das células fagocíticas e tecido linfóide, pois impede a fusão dos lisossomas com o fagossoma (Yaeger & Holler, 2007).

A principal fonte de disseminação da *B. abortus* são os animais infectados. A infecção ocorre, geralmente, por ingestão de produtos derivados do aborto, isto é, fetos abortados, placenta e fluidos uterinos, ou de material contaminado por estes produtos. A *B. abortus* pode estar presente nos fluidos uterinos desde as duas semanas imediatamente anteriores ao parto/aborto, até duas a três semanas depois (Yaeger & Holler, 2007). A infecção congénita pode ocorrer nos vitelos nascidos de fêmeas infectadas, no entanto, a sua frequência é baixa (Radostits *et al*, 2007a). Nos machos, a brucelose pode causar orquite, epididimite e inflamação de órgãos reprodutivos acessórios. Apesar da transmissão ocorrer através do sémen, os machos parecem desempenhar um papel pouco significativo na sua disseminação (Yaeger & Holler, 2007).

Depois da ingestão, a *Brucella* penetra na mucosa nasal ou oral, indo localizar-se nos gânglios linfáticos. Seguidamente, durante a bacteriémia, infecta o útero grávidico e multiplica-se nos trofoblastos corioalantóicos, levando à necrose do trofoblasto e à ulceração do corioalantóide (Yaeger & Holler, 2007).

Depois da infecção ser estabelecida nos animais sexualmente maduros, tende a persistir indefinidamente. Porém, nem todas as infecções resultam em abortos, e apenas uma percentagem inferior a 20% de vacas infectadas abortam mais do que uma vez (Yaeger & Holler, 2007).

O aborto é o único sinal clínico primário de brucelose. Os abortos causados por esta bactéria ocorrem, normalmente, a partir do quinto mês de gestação. Muitas vezes, as vacas abortadas apresentam retenção placentária e metrite (Yaeger & Holler, 2007). Ocasionalmente, ocorre morte fetal, mas esta não é logo procedida por aborto, de modo a que o feto fica retido, ocorrendo mumificação ou maceração. Algumas vacas não abortam mas os seus vitelos nascem fracos (Parkinson, 2009b).

A lesão mais consistente é a placentite. Nos casos mais severos a placenta intercotiledonar apresenta-se seca e espessada, podendo estar coberta por um exsudado amarelado; os cotilédones podem estar necrosados e cobertos por exsudados. Os pulmões fetais podem estar aumentados, firmes e cobertos por fibrina (Yaeger & Holler, 2007).

O diagnóstico definitivo requer o isolamento de brucelas a partir dos tecidos fetais ou fluidos uterinos. O organismo pode ser isolado do conteúdo abomasal do feto, pulmões e placenta, no entanto, também pode ser encontrado no colostro, leite e mecónio. Caso as lesões indiquem que se trata de brucelose e o isolamento tenha sido negativo, podem ser realizadas análises

imunohistoquímicas (Yaeger & Holler, 2007). Os testes disponíveis para a demonstração da presença da *B. abortus* são a examinação microscópica, a cultura e tipificação, o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), as serologias, como o teste rosa bengala, o teste de fixação do complemento, o teste de aglutinação lenta, ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay) indirecto, ELISA de competição, teste de ensaio de polarização fluorescente e o teste do anel do leite (*milk ring test*) (Godfroid, Bosman, Herr & Bishop, 2004).

2.6.2. Campilobacteriose

Existem várias espécies de *Campylobacter*, no entanto, a espécie mais largamente associada ao aborto bovino é a *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* (Anderson, 2007). No entanto, a subespécie *C. fetus fetus*, comensal do tracto intestinal, também pode causar abortos esporádicos (Cabell, 2007).

A campilobacteriose é uma doença venérea causada por uma bactéria gram negativa, microaerofila, com motilidade (Van der Walt, 2004). Trata-se de um agente obrigatório do tracto reprodutivo das vacas, pénis e prepúcio dos touros (Hillman & Gilbert, 2008), responsável por causar grandes perdas económicas devido a baixas taxas de concepção, aumento da taxa de refugo por infertilidade, diminuição média do peso dos vitelos ao desmame e aumento do intervalo entre partos (Yaeger & Holler, 2007).

Os bovinos são o reservatório desta bactéria, sendo que os machos não apresentam sinais clínicos (Yaeger & Holler, 2007), não se verificando alterações na qualidade do seu sémen nem no seu comportamento reprodutivo (Parkinson, 2009b). Normalmente, a infecção é transitória nas fêmeas e nos machos jovens (com menos de três anos de idade, os machos tendem a ser resistentes à infecção, eliminando o microorganismo em poucas semanas). Os machos com idade superior ou igual a quatro anos tendem a ser portadores crónicos, uma vez que as criptas epiteliais existentes na mucosa peniana se desenvolvem com a idade, tornando-se no habitat ideal para a bactéria (Yaeger & Holler, 2007).

A principal via de transmissão é a venérea (Parkinson, 2009b). A transmissão entre machos pode ocorrer caso estes apresentem actividade de monta entre si, ou caso os materiais utilizados na recolha de sémen estejam contaminados. As vacas ficam infectadas quando é praticada a monta natural com machos infectados, ou quando é realizada inseminação artificial com sémen contaminado. Entre fêmeas pode ocorrer transmissão se o material utilizado nos procedimentos reprodutivos estiver contaminado (Yaeger & Holler, 2007).

A bactéria, transmitida através do coito, coloniza a vagina e o cérvix, expandindo-se para o útero e oviductos em 12 a 14 dias (Yaeger & Holler, 2007). Este microorganismo não interfere na fertilização (Parkinson, 2009b), no entanto, a infecção uterina muitas vezes causa morte embrionária precoce devido à inflamação que ocorre em resposta à presença do agente (Yaeger & Holler, 2007). Normalmente, a morte embrionária ocorre entre os 15 a 80 dias de gestação, quando há uma rápida multiplicação do agente. Menos frequentemente, pode ocorrer uma multiplicação lenta, pelo que os abortos são mais tardios. Mesmo quando ocorre uma multiplicação rápida, há um atraso no retorno ao estro, pois a morte embrionária ocorre depois do reconhecimento materno da gestação (Yaeger & Holler, 2007).

A bactéria é gradualmente eliminada do útero e oviducto, e os animais retornam aos índices de fertilidade normais. Porém, frequentemente, o agente mantém-se no cérvix e na vagina, pelo que durante esse período a vaca mantém-se como fonte de infecção para outros animais. As vacas infectadas, normalmente, desenvolvem imunidade e conseguem eliminar o organismo em 3 a 6 meses, ficando resistentes à reinfecção durante um curto período de tempo (Yaeger & Holler, 2007). Assim, gradualmente, a exploração vai ficando imune (as vacas ficam livres da infecção após o parto). No caso dos machos infectados permanecerem na exploração, pode ocorrer re-infecção das vacas, no entanto, este problema é muito menos severo. A campilobacteriose também é perpetuada quando são introduzidos na exploração animais que não se encontram imunizados (Parkinson, 2009b).

Este agente provoca uma endometrite ligeira, que não é detectável por palpação rectal. O primeiro sinal de campilobacteriose genital é um grande aumento do número de vacas que retornam ao cio, regular ou irregularmente, depois de terem sido cobertas por um macho recentemente introduzido na exploração. As taxas de gestação são baixas (40 a 70%). Nas explorações em que a campilobacteriose é endémica, os sinais clínicos são principalmente observados em novilhas ou em animais recentemente introduzidos (Yaeger & Holler, 2007).

Os abortos são observados, ocasionalmente, entre o 4º e o 7º mês de gestação [Thompson & Blaser (2000), citados por Parkinson (2009b)]. Na placenta, normalmente, é observada placentite intercotiledonar fibrinosa com áreas necrosadas. Os cotilédones podem apresentar uma descoloração amarelo-acastanhada e os fetos abortados podem exibir exsudação fibrinosa na cavidade pleural e peritoneal, ou ainda no saco pericárdico, assim como esplenomegália. As imunoglobulinas fetais podem estar elevadas. Histologicamente, observa-se placentite neutrofílica fibrinosa, broncopneumonia neutrofílica, serosite fibrinosa e neutrofílica e abomasite (Anderson, 2007).

O diagnóstico de campilobacteriose é baseado no isolamento do agente, na demonstração da sua existência nos tecidos fetais, raspagens prepuciais ou muco vaginal, através de testes de imunofluorescência directa. Também podem ser detectados anticorpos no muco vaginal através de análises ELISA ou testes de aglutinação (Yaeger & Holler, 2007).

O diagnóstico é realizado de modo distinto consoante se trate de um problema de infertilidade ou de aborto. Na presente dissertação apenas será abordado o segundo caso. Assim, pode ser realizado um diagnóstico presuntivo baseado na detecção de pequenos microorganismos com movimentos rápidos no conteúdo abomasal do feto, através do uso de um microscópio de fundo negro ou de contraste de fase. O diagnóstico definitivo deve ser realizado através do isolamento de *Campylobacter* de amostras de placenta, pulmões ou conteúdo abomasal do feto (Yaeger & Holler, 2007). Para que se possa fazer uma diferenciação entre as diferentes espécies desta bactéria, são realizadas análises imunohistoquímicas (Anderson, 2007). É necessário ter em consideração que as análises serológicas são de pouco valor, uma vez que a campilobacteriose genital não provoca aumentos relevantes dos níveis de anticorpos séricos. A imunofluorescência, isoladamente ou combinada com a cultura do agente, pode ser de elevado valor para este diagnóstico. Também pode ser utilizado o PCR (Parkinson, 2009b).

2.6.3. Histophilose

O *Histophilus somni* é um cocobacilo gram negativo, não esporulado. Este agente encontra-se associado a um complexo de doenças que incluem meningoencefalite tromboembólica, poliartrite, pneumonia, miocardite e infecção do tracto reprodutivo (Yaeger & Holler, 2007). Os isolados de *H. somni* de ovinos e bovinos apresentam diferenças nas reacções bioquímicas, nos perfis das principais proteínas das membranas externas e na análise de DNA (Ward, Jaworski, Eddow & Corbeil, 1995).

Esta bactéria encontra-se, frequentemente, na vagina dos bovinos, sendo uma causa importante de vaginite, endometrite (Yaeger & Holler, 2007), cervicite e aborto (Parkinson, 2009b). Por vezes, é também isolada a partir do tracto genital de vacas saudáveis, podendo permanecer na vagina por longos períodos de tempo, sem que os animais apresentem quaisquer sinais clínicos. Foi possível, em laboratório, reproduzir abortos, em qualquer fase de gestação, causados pelo *H. somni*. Apesar disso, são raros os surtos de abortos documentados, sendo a sua maioria esporádicos. Sabe-se, no entanto, que este microorganismo consegue aderir à zona pelúcida de embriões intactos e causar a sua degeneração (Yaeger & Holler, 2007).

Esta bactéria parece não causar doença reprodutiva importante nos touros (Yaeger & Holler, 2007), apesar de ser regularmente isolada no sémen (Janzen *et al*, 1981). No entanto, Barber, Momont, Tibary e Sedgwick (1994), citados por Parkinson (2009b) através de um estudo de caso, chegaram à conclusão de que o organismo poderia causar degeneração testicular.

A transmissão a outros animais parece ser realizada através da contaminação ambiental por corrimentos respiratórios ou vaginais, e ainda pela urina. Pensa-se também que os machos portadores possam infectar as fêmeas (Yaeger & Holler, 2007).

Actualmente, é sugerido que o aborto é secundário à disseminação hematogénea, que ocorre após a infecção do tracto respiratório ou da vagina. Os estudos realizados em laboratório não evidenciam que haja uma infecção ascendente através do cérvix. Sabe-se também que ocorre morte embrionária sem que sejam causadas lesões uterinas importantes (Yaeger & Holler, 2007).

O agente provoca placentite necrosupurativa, associada a edema da placenta. O exame microscópico do feto e placenta revelam, na sua grande maioria, vasculite (Yaeger & Holler, 2007).

O seu diagnóstico é feito através do isolamento a partir de uma cultura pura. Os resultados desta cultura, realizada a partir de amostras fetais ou placentárias, devem ser cuidadosamente interpretados, tendo em consideração as lesões da placenta, principalmente a vasculite (Yaeger & Holler, 2007).

2.6.4. Leptospirose

As leptospirosas são pequenas espiroquetas aeróbias. Os seus serótipos encontram-se divididos em dois grandes grupos, os patogénicos e os saprófitas. Os serótipos patogénicos pertencem à espécie *Leptospira interrogans*, sendo conhecidos mais de 200 serovares diferentes (Yaeger & Holler, 2007).

Tal como a brucelose, a leptospirose é uma doença zoonótica (Givens & Marley, 2008).

Existem dois grupos de hospedeiros diferentes, os reservatório e os acidentais. Nos hospedeiros reservatório, a transmissão de espiroquetas entre animais é fácil, há uma grande incidência de infecção, prevalece fundamentalmente a doença crónica e há persistência da infecção no rim e tracto genital. O diagnóstico nestes hospedeiros é complexo, uma vez que os níveis de anticorpos são baixos, assim como o número de espiroquetas encontradas nos tecidos. A infecção acidental provoca doença aguda, ocorre apenas transmissão esporádica entre os hospedeiros e existe uma curta fase de infecção renal. Na leptospirose aguda os

títulos de anticorpos encontram-se bastante elevados e são encontradas inúmeras espiroquetas nos tecidos do animal infectado (Yaeger & Holler, 2007).

Os bovinos funcionam como hospedeiros reservatório para a *L. interrogans hardjo* (sendo conhecidos dois genótipos de maior importância em bovinos, o *hardjobovis* e o *hardjoprajitano*), e como hospedeiros acidentais para a *L. interrogans pomona* (Yaeger & Holler, 2007) e para a *L. interrogans icterohaemorrhagiae* e *gryppotyphosa* (Anderson, 2007).

Entre hospedeiros reservatório a transmissão envolve, muitas vezes, o contacto directo com urina, fluidos placentários ou leite infectados, podendo também ocorrer transmissão venérea (principalmente quando serovar *hardjo* está envolvido) e transplacentária. A infecção acidental, normalmente, ocorre por contacto indirecto com fontes de água ou outras fontes ambientais contaminadas pela urina dos hospedeiros reservatório. A infecção dos animais susceptíveis ocorre através das membranas mucosas (dos olhos, nariz, vagina e pénis) e também através de abrasões ou de zonas cutâneas enfraquecidas por terem estado em contacto com a água durante longos períodos de tempo (Yaeger & Holler, 2007).

O período de incubação estende-se de 4 a 10 dias. A bacteriémia pode estar associada a episódios agudos da doença. O microorganismo persiste em vários tecidos, inclusive no rim (multiplicam-se nos tubúlos proximais) e no tracto genital, estando as leptospirosas presentes na urina, nos fluidos uterinos do pós-parto e no sêmen. Nas infecções causadas pelo serovar *hardjo* em bovinos, as espiroquetas são disseminadas constantemente através da urina durante 4 a 6 semanas, e durante 6 a 12 meses são disseminadas de forma intermitente. Porém, a excreção urinária de espiroquetas pode prolongar-se por toda a vida do animal. Quando se trata do genótipo *hardjoprajitano*, a via venérea tem maior importância na disseminação da infecção relativamente à excreção na urina (Yaeger & Holler, 2007).

Nas vacas não gestantes as infecções são, normalmente, subclínicas. Pelo contrário, nos animais gestantes, a infecção fetal pode resultar em aborto, nados-mortos ou no nascimento de vitelos fracos. Os serovares *hardjo* e *pomona* são os mais frequentemente implicados (Yaeger & Holler, 2007), no entanto, o *icterohaemorrhagiae* e o *gryppotyphosa* também podem estar associados ao aborto bovino, embora mais raramente (Anderson, 2007). Os abortos ocorrem no último trimestre da gestação (*pomona*) ou a partir do quarto mês (*hardjo*). A sua percentagem é menor quando o surto é provocado pelo serovar *hardjo*, no entanto, a infertilidade encontra-se frequentemente associada a este serovar (Yaeger & Holler, 2007).

Não existem lesões específicas de leptospirose, no entanto, a placenta muitas vezes exhibe edema intercotiledonar e os cotilédones podem apresentar-se flácidos. Os fetos abortados

encontram-se, muitas vezes, severamente autolisados. A nefrite intersticial fetal, se presente, é uma lesão patognomónica (Parkinson, 2009b).

Os fetos abortados podem estar ictericos e os seus rins, microscopicamente, podem apresentar focos de necrose tubular, com infiltrados linfocitários e de células plasmáticas, intersticiais e perivasculares. No fígado, podem ser encontrados tampões de bÍlis nos canálculos (Yaeger & Holler, 2007). Também foi já reportada a ocorrência meningite não supurativa (Anderson, 2007).

O diagnóstico deve ser baseado na demonstração de anticorpos específicos no soro fetal ou materno, ou pela demonstração da existência destas espiroquetas nos fluidos fetais ou na urina da vaca, através de um microscópio de fundo negro ou através de imunofluorescência (Parkinson, 2009b). No entanto, uma vez que o seu isolamento e identificação são processos difíceis e morosos, não são realizados rotineiramente. Dado que os anticorpos maternos não ultrapassam a placenta, a demonstração de anticorpos num feto de 4 ou mais meses de gestação é indicativo de infecção uterina, pois só nesta fase este apresenta um sistema imunitário competente (Yaeger & Holler, 2007).

Os testes de aglutinação microscópica são realizados em amostras de soro materno. Estes resultados devem ser cuidadosamente interpretados, uma vez que existem diferenças nas respostas imunitárias consoante se tratem de hospedeiros reservatório ou acidentais. Além disso, existem também reacções cruzadas, e ainda a possibilidade de presença de anticorpos vacinais. Assim, existe uma forte probabilidade do aborto ter sido causado por leptospirose caso sejam encontrados títulos elevados ($\geq 1:1000$) na altura do aborto num animal que não tenha sido recentemente vacinado. São comuns títulos elevados, após o aborto, nos hospedeiros acidentais, no entanto, nos hospedeiros reservatório, os títulos encontram-se estáticos ou em declínio (um terço dos animais que abortam devido a leptospirose apresentam títulos inferiores a 1:100) (Yaeger & Holler, 2007). As vacinas multivalentes, normalmente, apresentam títulos baixos e de curta duração, comparativamente aos produzidos pelo contacto com o agente. Além disso, as bacterinas multivalentes apresentam títulos elevados para vários serovares, o que não se verifica na infecção natural (Anderson, 2007).

2.6.5. Listeriose

A *Listeria monocytogenes* é um cocobacilo gram positivo, ubiquitário, responsável por causar doença em animais e humanos. Dentro do género *Listeria* são conhecidas 5 espécies, sendo a *L. monocytogenes* o principal agente patogénico. Os abortos bovinos são normalmente

causados pelos serovares 1 e 4b, no entanto, a *L. ianovii* também tem sido, com menor frequência, associada ao aborto (Yaeger & Holler, 2007). Muitos dos surtos de listeriose estão associados a silagem de baixa qualidade, com pH superior ao recomendado, devido a fermentação inadequada – silagem butírica (Parkinson, 2009b).

Esta bactéria é primariamente um agente do sistema nervoso central (Parkinson, 2009b). Nos ruminantes, é responsável por causar encefalite, septicémia neonatal, aborto e mastite (Yaeger & Holler, 2007). Sabe-se também que pode ocorrer infecção cruzada entre bovinos e ovinos (Parkinson, 2009b).

Normalmente, a infecção ocorre pela ingestão de material contaminado (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007b). Os fetos abortados, a placenta e os fluidos uterinos contêm uma elevada quantidade de bactérias, tal como as fezes dos animais (mesmo quando saudáveis, durante um surto, estes eliminam o microorganismo nas fezes), podendo contaminar as fontes de alimento e água, o que leva à infecção de outros animais (Yaeger & Holler, 2007).

A maioria dos abortos causados por este agente ocorrem esporadicamente, no entanto, existem relatos de surtos graves (Anderson, 2007). O período de incubação no caso do aborto é de, normalmente, 5 a 12 dias. Pensa-se que a infecção fetal se deva à disseminação hematogénea do agente a partir da placenta. O decréscimo causado na fertilidade é passageiro e os animais que abortam, normalmente, tornam-se resistentes à reinfeção (Yaeger & Holler, 2007). Nos animais adultos pode causar encefalite, no entanto, raramente esta se encontra associada ao aborto (Anderson, 2007).

Os abortos são resultado de uma placentite aguda, procedida de septicémia fetal (Yaeger & Holler, 2007). Os fetos, normalmente, apresentam um elevado grau de autólise, tornando complicada a visualização das lesões. As lesões típicas são focos múltiplos de necrose amarelados ou acinzentados no fígado e cotilédones (Parkinson, 2009b). Estes focos podem ser confundidos com as lesões necróticas causadas por IBR (Yaeger & Holler, 2007).

As lesões microscópicas consistem, como referido anteriormente, em placentite aguda e em hepatite necrosante a necrosupurativa. Podem também ser identificadas colónias bacterianas no lúmen de vários vasos e nas lesões hepáticas (Yaeger & Holler, 2007).

O diagnóstico pode ser feito através da identificação de listerias no abomaso ou fígado fetais, na placenta e nos corrimentos vaginais, através da visualização de um esfregaço directo (coloração Gram) ou por imunofluorescência. Os testes serológicos não são usados (Parkinson, 2009b). A presença de listerias pode ser confirmada em tecidos fixados através de

análises de imunohistoquímica. Com menor frequência, podem ser usados métodos moleculares (Yaeger & Holler, 2007).

2.6.6. Salmonelose

A *Salmonella* é uma bactéria intracelular facultativa pertencente à família das Enterobacteriaceae. Nos bovinos, a salmonelose apresenta grande importância devido aos surtos que provoca e também por se tratar de uma doença zoonótica. As espécies de *Salmonella* responsáveis por causar abortos em bovinos são a *S. dublin*, *S. typhimurium* (Radostits *et al*, 2007a) e a *S. newport* (Parkinson, 2009b). Apesar de a *S. typhimurium* poder ser endêmica nestes animais, a sua importância nos abortos é relativamente baixa (Parkinson, 2009b). Na Nova Zelândia, a *S. brandenburg* é uma importante causa de aborto bovino [Clark *et al.* (2004), citado por Parkinson (2009b)].

Os animais infectam-se por contacto directo com animais infectados ou por contacto indirecto (Radostits *et al*, 2007a), ao pastarem em locais contaminados com fezes de animais infectados, esgotos humanos ou águas provenientes de rios contaminados (Radostits *et al*, 2007a; Parkinson, 2009b). Presume-se assim, que a infecção tenha origem no tracto intestinal (Anderson, 2007). Os episódios de bacteriemia fazem com que o agente consiga atingir os placentomas (Anderson, 2007) em 6 a 8 dias após a infecção (Parkinson, 2009b), levando à destruição das vilosidades fetais, o que provoca aborto sem que seja necessária a infecção bacteriana do feto (Anderson, 2007), ou seja, o aborto ocorre como consequência de placentite (Parkinson, 2009b).

Os sinais clínicos nos bovinos adultos são febre elevada ($> 40^{\circ} \text{C}$), diarreia e disenteria severas, que podem ou não estar associadas aos abortos (Parkinson, 2009b). Os abortos causados por *S. dublin* podem ocorrer espontaneamente sem que se verifiquem na exploração sinais prévios da presença de salmonelose. Os abortos são mais comuns entre os dias 124 e 270 de gestação. As vacas que abortam podem apresentar febre, anorexia e hipogaláctia, ocorrendo por vezes retenção placentária. Muitas vezes, não ocorre aborto, nascendo vitelos prematuros que morrem em poucos dias. A *S. typhimurium* apresenta um quadro semelhante, no entanto, verificam-se síndromes mais severas nos vitelos jovens (Radostits *et al*, 2007a). Na maioria dos casos, apenas um ou dois animais da exploração são afectados, no entanto, já foram reportados surtos em que muitos dos animais da exploração sofreram abortos e apresentaram sinais de doença entérica (Parkinson, 2009b). Esta doença é menos frequente nos animais que se encontram em pastagem (Radostits *et al*, 2007a).

Muitos animais tornam-se portadores assintomáticos da *S. dublin*, servindo como fonte de infecção para os restantes, uma vez que podem continuar a eliminar o agente, inclusive no leite. Deste modo, muitos dos vitelos presentes na exploração mostram sinais de pneumonia e septicémia, acabando muitas vezes por morrer (Metre, Tennant & Whitlock, 2008).

O feto abortado, normalmente, encontra-se autolisado, podendo estar enfisematoso. A corioalantóide apresenta-se espessada, com exsudado fibrinoso, e a sua superfície coriônica afigura-se acinzentada ou avermelhada; algumas zonas carunculares encontram-se aderentes aos cotilédones. Microscopicamente, pode ser observada placentite neutrofílica com mineralização e proliferação bacteriana. Por vezes, o fígado também manifesta algum grau de hepatite supurativa multifocal. As lesões pulmonares resumem-se a um exsudado bronquial neutrofílico (Anderson, 2007).

As vacas que abortam excretam o agente durante um curto período de tempo (Parkinson, 2009b). O diagnóstico definitivo é realizado através de cultura e isolamento a partir de amostras de fezes, sangue, leite e outros fluidos corporais ou tecidos. É necessário ter em atenção o facto de alguns animais, os portadores assintomáticos, excretarem o agente intermitentemente, enquanto os portadores silenciosos não o excretam. A serologia também pode ser útil, sendo preferíveis as análises ELISA baseadas nos antígenos flagelares para a estimação da seroprevalência. Também podem ser utilizadas análises de aglutinação, no entanto, os testes ELISA são mais económicos (Veling *et al*, 2000).

2.6.7. Micoplasmose

O género *Mycoplasma* e *Ureaplasma* pertencem à família das Mycoplasmataceae, sendo microorganismos pleomórficos, sem parede celular (Yaeger & Holler, 2007). A micoplasmose tem sido associada a aborto e infertilidade, tanto nos machos como nas fêmeas (Parkinson, 2009b). Uma vez que estes agentes fazem muitas vezes parte da flora do tracto urogenital dos bovinos, sendo frequentemente isolados na ausência de doença, torna-se difícil associá-los a problemas de infertilidade. Várias espécies de *Mycoplasma* podem também ser encontradas no tracto respiratório superior dos bovinos, mesmo na ausência de sinais clínicos (Yaeger & Holler, 2007).

Estes microorganismos são transmitidos através da monta natural ou por inseminação artificial realizada com materiais contaminados. A infecção pode ainda ser contraída por contacto directo, durante o nascimento, e ainda através da contaminação ambiental com urina de animais infectados (Yaeger & Holler, 2007).

A Micoplasmose parece ser uma causa pouco comum de aborto bovino (Yaeger & Holler, 2007), no entanto, existem duas espécies de *Mycoplasma* que se encontram associadas a doença reprodutiva nos bovinos, o *M. bovis* e o *M. bovigenitalium* (Parkinson, 2009b). A infecção por *M. bovigenitalium* pode causar vulvovaginite granular, infertilidade e endometrite. Experimentalmente, provou-se que o *M. bovis* pode causar endometrite, salpingite, infertilidade e aborto (Givens & Marley, 2008), sendo responsável por mastites nos bovinos adultos e poliartrite, queratoconjuntivite e doença respiratória em vitelos (Radostits *et al*, 2007b). Nos abortos causados por *Mycoplasma* spp, as características histológicas são placentite, broncopneumonia supurativa, miocardite subaguda e epicardite (Yaeger & Holler, 2007).

O *Ureaplasma diversum* causa vulvite (Yaeger & Holler, 2007), endometrite e salpingite (Parkinson, 2009b). Maioritariamente, este microorganismo provoca mortes embrionárias, no entanto, também pode causar aborto, embora menos frequentemente (Parkinson, 2009b), podendo ainda levar ao nascimento de vitelos fracos (Givens & Marley, 2008; Parkinson, 2009b). Este microorganismo é, muitas vezes, isolado acidentalmente em surtos de abortos provocados por outros agentes. O *U. diversum* também pode infectar o tracto genital masculino, no entanto, actualmente, pensa-se que não cause doença genital nos machos (Parkinson, 2009b). Os problemas reprodutivos causados por este agente podem persistir durante 6 meses (Yaeger & Holler, 2007). Os abortos ocorrem com maior frequência no último terço de gestação. Os fetos, normalmente, encontram-se pouco autolisados e a retenção placentária é frequente (Anderson, 2007). A placenta intercotiledonar encontra-se espessada e opaca, com uma coloração esbranquiçada ou mesmo acastanhada. Microscopicamente, observa-se placentite, caracterizada por infiltrados de células mononucleares, acompanhados por fibrose, necrose, mineralização e vasculite dos vasos amnióticos e corioalantóicos. Frequentemente, observa-se também alveolite não supurativa (Yaeger & Holler, 2007).

O diagnóstico definitivo é realizado através do isolamento destes agentes a partir de culturas de amostras pulmão e conteúdo abomasal fetais, carúnculas, cotilédones e líquido amniótico. Este isolamento deve ser cuidadosamente interpretado e deve ter em consideração as características das lesões observadas (Yaeger & Holler, 2007).

2.6.8. Clamidiose

A *Chlamydomphila* sp. é uma bactéria intracelular obrigatória que se multiplica no citoplasma das células eucarióticas. No seu ciclo, distinguem-se duas formas diferentes, os corpos

elementares e os reticulados, constituindo os últimos a sua forma replicativa (Yaeger & Holler, 2007). Actualmente, reconhecem-se três espécies de *Chlamydophila* com importância em bovinos, a *C. abortus*, a *C. pecorum* e a recentemente reconhecida *Chlamydophila-like Waddlia chondrophila* (Livingstone & Longbottom, 2006).

Nos bovinos, a clamidiose encontra-se associada a queratoconjuntivite, pneumonia, enterite, poliartrite, poliserosite, encefalomielite, mastite, vesiculite seminal, infertilidade e aborto (Yaeger & Holler, 2007). Os abortos causados pela *C. abortus*, normalmente, ocorrem após o sétimo mês de gestação (Parkinson, 2009b). Estes abortos são esporádicos, contrariamente ao aborto enzoótico causado pela clamidiose em pequenos ruminantes (Livingstone & Longbottom, 2006). Das infecções ocorridas no último trimestre de gestação pode resultar o nascimento de vitelos fracos. Frequentemente, ocorre retenção placentária após o aborto. A *C. pecorum* encontra-se frequentemente associada a endometrite, infertilidade e aborto (Parkinson, 2009b). A *Chlamydophila abortus*, antigamente designada por *Chlamydia psittaci* serótipo 1, também pode causar abortos na mulher, ou seja, esta doença tem um carácter zoonótico (Givens & Marley, 2008).

As clamídias podem ser excretadas nas fezes, urina, corrimentos nasais, oculares, vulvares ou uterinos (Yaeger & Holler, 2007), assim como nos produtos resultantes do aborto (Radostits *et al*, 2007d). A infecção pode ocorrer tanto por inalação como por ingestão de materiais contaminados. Esta bactéria foi também identificada no epididímio, glândulas sexuais acessórias, rim, sêmen e urina de machos bovinos inoculados experimentalmente (Yaeger & Holler, 2007).

A placenta encontra-se espessada e necrosada nas zonas intercotiledonares, ocorrendo também necrose das vilosidades cotiledonares. Ainda na placenta, pode ser observada vasculite necrosante, acompanhada de edema. Os fetos abortados tardiamente na gestação exibem ascite, o fígado apresenta hepatomegália e uma coloração amarelo-avermelhada, e os linfonodos encontram-se difusamente aumentados (Yaeger & Holler, 2007).

O diagnóstico pode ser realizado através da serologia (a partir do sangue do animal que abortou ou dos fluidos torácicos do feto) ou através da demonstração da presença do agente nos tecidos fetais ou na placenta. As amostras ideais para o isolamento são a placenta ou os fluidos libertados por um animal que tenha abortado recentemente. O diagnóstico definitivo pode ser feito através de imunofluorescência, em esfregaços placentários por aposição, ou ainda pela cultura e isolamento dos microorganismos através dos fluidos uterinos, placenta, pulmão ou fígado fetais, com ELISA de captura ou PCR. As análises de imunohistoquímica também podem ser realizadas em amostras fixadas (Yaeger & Holler, 2007).

2.6.9. Bactérias oportunistas

As bactérias oportunistas podem ser divididas em duas grandes categorias, as que integram a microflora normal das superfícies mucosas (*Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia hemolytica*, *Histophilus somni*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.) e as bactérias ambientais (*Bacillus* spp, *Pseudomonas* sp. e *E. coli*) (Yaeger & Holler, 2007). Sabe-se hoje que um quarto a metade dos abortos bovinos se encontram associados a infecções causadas por bactérias deste grupo, sendo o *Arcanobacterium pyogenes* a bactéria mais frequentemente isolada (Anderson, 2007). Os abortos bacterianos esporádicos podem ocorrer em qualquer fase gestacional, no entanto, a maioria dos que são identificados ocorre na segunda metade da gestação (Anderson, 2007). O isolamento de um ou mais destes microorganismos a partir de fetos abortados, pode sugerir que foi possibilitado o seu acesso ao sistema circulatório materno, ou que os abortos são consequência de outro processo. Este acesso ao sistema circulatório pode ser devido a diversos factores, como a acidose clínica ou subclínica (ruminite), as lesões externas, ou ainda o acesso a alimentos grosseiros e de baixa qualidade, responsáveis por provocar pequenos traumas no tracto digestivo superior (Yaeger & Holler, 2007).

Os microorganismos patogénicos para os animais adultos, como a *Salmonella*, a *Mannheimia hemolytica*, o *H. somni* e a *P. multocida*, podem também causar abortos, pois originam doença materna. Neste caso, o aborto é secundário, pois a bacteriémia conduz à infecção fetal. Exceptuando a *Salmonella*, todos os outros são agentes ubiqüitários, podendo tornar-se oportunistas e causar aborto (Yaeger & Holler, 2007).

Para diagnóstico, é necessário que seja obtido um isolamento bacteriano numa cultura pura ou quase pura de amostras fetais e/ou placentárias. Para que se possa realizar um diagnóstico etiológico definitivo, estes isolamentos têm que estar de acordo com as lesões macro e microscópicas encontradas (Anderson, 2007). Para cultura bacteriana, normalmente, são usados a placenta, o conteúdo abomasal, o pulmão e o fígado fetais. A cultura de microorganismos a partir de amostras placentárias é sempre problemática devido à contaminação que ocorre durante a passagem na vagina e vulva, ou mesmo devido à contaminação ambiental. Mesmo assim, esta deve ser sempre enviada para análise, uma vez que muitos processos infecciosos se limitam à placenta, não sendo encontradas bactérias em número significativo nas amostras fetais (Yaeger & Holler, 2007).

As lesões mais comuns causadas por este tipo de bactérias são placentite e, por vezes, epicardite (quando o *Bacillus* spp. se encontra envolvido). Microscopicamente, observa-se placentite, broncopneumonia supurativa e, ocasionalmente, hepatite (Yaeger & Holler, 2007).

De modo a evitar que estes microorganismos atinjam a corrente sanguínea materna, deve otimizar-se o estado de saúde materno, através da melhoria da nutrição e ambiente e da redução de factores de stress (Yaeger & Holler, 2007).

2.6.10. BVD (Diarreia Bovina Viral)

O vírus da diarreia bovina viral (BVDV) pertence à família Flaviviridae, género *Pestivirus*, tratando-se de um vírus RNA (Collett, Anderson & Retzel, 1988). Esta infecção viral apresenta um grande impacto económico nas explorações afectadas devido às perdas reprodutivas que causa (Cabell, 2007), podendo resultar em aborto esporádico ou em importantes surtos de abortos (Parkinson, 2009b).

A sua transmissão pode ocorrer pela inalação ou ingestão de materiais contaminados com as secreções ou excreções de animais infectados, como a saliva, secreções oculonasais, urina, fezes, secreções uterinas, placenta e fluido amniótico, podendo também ocorrer transmissão vertical (Kelling, 2007).

Existem dois biótipos de BVDV, um citopático e um não citopático, sendo que o primeiro induz alterações microscópicas nas células como a vacuolização e lise celular (Kelling, 2007). As infecções transplacentárias podem resultar em morte embrionária, aborto, alterações congénitas ou infecção persistente (PI) (Kelling, 2007), nados-mortos e ainda vitelos saudáveis mas seropositivos (Parkinson, 2009b). A ocorrência destas diferentes formas clínicas depende da interacção de vários factores aquando da infecção: propriedades biológicas do vírus, idade e altura da gestação das fêmeas bovinas, nível de imunidade da exploração e a existência ou não de factores de stress (tabela 1) (Perdrizet, Rebhun, Dubovi & Donis, 1987).

Como já foi referido anteriormente, o vírus entra no organismo através da inalação ou ingestão, replicando-se nas amígdalas, tecidos linfóides e no epitélio da orofaringe. A virémia ocorre 2 a 4 dias após a infecção, levando à infecção placentária e fetal (Kelling, 2007). Este período virémico pode ser acompanhado de pirexia, inaptência, diarreia, depressão e alguma imunossupressão. Alguns animais podem apresentar corrimentos oculonasais, hipersalivação e erosões orais (Parkinson, 2009b).

As infecções agudas ocorrem em vitelos seronegativos mas imunocompetentes. Apesar da maioria destas infecções pós-natais serem inaparentes, pode surgir imunodepressão, podendo conduzir a um quadro multifactorial com doença respiratória e entérica em animais susceptíveis. A sua forma moderada é caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade.

A resposta imunitária é evidente e as lesões das mucosas são pouco relevantes. Esta forma é ainda caracterizada por pirexia, presença de corrimento nasal e leucopénia transitória (Kelling, 2007), sendo a forma clínica com maior impacto na fertilidade das explorações, uma vez que os sinais clínicos são modestos e passam muitas vezes despercebidos (Parkinson, 2009b). Os surtos da forma clínica severa são marcados por trombocitopénia, hemorragias e alta taxa de mortalidade (normalmente estes surtos estão associados a isolados de BVDV de grande virulência) (Kelling, 2007).

A infecção persistente ocorre quando o BVDV não citopático infecta o feto durante o terceiro ou quarto mês de gestação – nesta altura o feto ainda não apresenta um sistema imunitário competente, pelo que desenvolve imunotolerância ao vírus (Kelling, 2007). As vacas persistentemente infectadas (PI) originam sempre vitelos persistentemente infectados. Caso estes animais sejam infectados pelo biótipo citopático, desenvolvem doença das mucosas (BVD-MD), havendo algumas evidências de que o biótipo não citopático sofre uma mutação para citopático nos PI's. Os PI's excretam o vírus durante toda a sua vida, representando a maior fonte de infecção para os outros animais. Actualmente, pensa-se que o biótipo citopático não tenha capacidade para causar infecção transplacentária (Parkinson, 2009b). Estes animais não produzem títulos de anticorpos detectáveis contra o BVDV, devido à sua imunotolerância ao vírus (Kelling *et al*, 1990). Normalmente, nascem fracos, têm taxas de crescimento reduzidas (pensa-se que o vírus iniba a mitose celular) (Kelling *et al*, 1990) e tendem a morrer entre os seis meses e os dois anos de vida com BVD-MD. Apesar disso, alguns PI's chegam à idade reprodutiva (Cabell, 2007). A BVD-MD apresenta lesões erosivas ou ulcerativas características na zona do espelho e lábios, mucosa bucal e língua (Kelling, 2007).

Como foi referido anteriormente, podem nascer vitelos com defeitos congénitos, tais como, hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, microcefalia, cataratas oculares, microftalmia, atrofia da retina, neurite óptica, braquignatias e alopecia, entre outras alterações (Parkinson, 2009b).

Os abortos podem surgir em qualquer fase, no entanto, a grande maioria das perdas de gestação ocorre antes do terceiro trimestre de gestação (Parkinson, 2009b).

Os fetos abortados, normalmente, encontram-se em avançado estado de autólise. Não existem lesões patognomónicas de infecção pelo BVDV, porém, a presença de dermatite, meningite, bronquiólite e lesões no córtex cerebelar é comum (Parkinson, 2009b).

Idealmente, o feto deve ser enviado para laboratório, de modo a que possam fazer as análises não só para confirmar a presença de BVDV, mas também para excluir outras possíveis causas de aborto bovino. O diagnóstico é fundamentado quando é confirmada a infecção fetal por

BVDV, conjuntamente com a presença de lesões microscópicas características e com a história clínica dos animais e da exploração (Kelling, 2007). O RT-PCR (*real time reverse transcriptase*) está agora disponível para pesquisa de BVDV. As análises de imunofluorescência indirecta permitem a detecção de anticorpos em fetos com mais de 125 dias de gestação, enquanto as análises imunohistoquímicas podem ser usadas em abortos ocorridos no primeiro trimestre de gestação, usando como amostra o cérebro fetal fixado (Cabell, 2007). A interpretação dos títulos de anticorpos é difícil, sendo que títulos altos podem ser indicativos de história de BVDV na exploração. No entanto, os animais entre os 6 a 12 meses de idade, não vacinados, podem ser usados como sentinelas, podendo servir para determinar se a infecção se encontra activa na exploração ou não (Parkinson, 2009b).

Tabela 3 – Consequências reprodutivas da infecção pelo BVDV nas diferentes fases gestacionais. Adaptado de Grooms, 2004.

Infecção pelo BVDV nos diferentes estadios de gestação	Efeitos reprodutivos
Fase embrionária (até ao dia 45)	<ul style="list-style-type: none"> - Baixas taxas de concepção - Morte embrionária
Do dia 45-175	<ul style="list-style-type: none"> - Aborto - Imunotolerância (quando a infecção ocorre entre os dias 18 a 125 de gestação) - Defeitos congénitos (quando a infecção ocorre ente os dias 100 a 150)
Do dia 125-285	<ul style="list-style-type: none"> - Aborto - Nascimento de vitelos fracos - Nascimento de vitelos saudáveis (mais comum)

BVDV: Vírus da Diarreia Bovina Viral.

2.6.11. IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina)

O vírus BHV-1 (Herspesvírus Bovino serótipo 1) é membro da família Herpesviridae, subfamília α -Herpesvirinae. A infecção por BHV-1 provoca doença respiratória e reprodutiva, causando aborto, rinite, conjuntivite e traqueíte (Kelling, 2007), assim como encefalomielite e

infecção sistémica fatal nos neonatos (Anderson, 2007), podendo também contribuir para o desenvolvimento de broncopneumonia bacteriana. Quando a infecção acontece em fêmeas gestantes não imunes, ocorre infecção sistémica e fetal. As infecções genitais podem levar ao desenvolvimento de vulvovaginite pustular e balanopostite que, normalmente, se resolvem espontaneamente (Kelling, 2007). Quando as fêmeas são infectadas precocemente na gestação pode ocorrer morte embrionária (Anderson, 2007).

Este vírus tem a particularidade de estabelecer infecções latentes nos gânglios trigémio e sagrado, pelo que quando os animais sofrem episódios de imunossupressão, o vírus pode ser reactivado. Estes animais representam uma fonte de infecção para os outros animais (Givens & Marley, 2008).

A sua transmissão ocorre através do contacto do vírus com o tracto respiratório superior, mucosas conjuntivais e tracto genital, assim como com fetos abortados. Também é possível ocorrer transmissão venérea. As vacas podem apresentar febre, anorexia, tosse e conjuntivite. Estes sinais são precedidos por aborto em 15 a 64 dias. O aborto, normalmente, ocorre entre o quarto e o oitavo mês de gestação (Givens & Marley, 2008).

A exposição ao vírus dos animais gestantes que nunca contactaram com este e que não foram vacinados, pode resultar em surtos de abortos em que 25 a 60% das vacas abortam (Anderson, 2007), no entanto, também podem ocorrer abortos esporádicos, principalmente nas explorações com história prévia de infecção ou vacinação (Kelling, 2007).

Normalmente, os fetos encontram-se em estado avançado de autólise. O rim fetal apresenta, frequentemente, necrose do córtex, com hemorragia e edema peri-renal. Histologicamente, podem observar-se focos hepáticos de necrose, podendo estes surgir também no cérebro, pulmões, baço, córtex adrenal e linfonodos. Na periferia destas lesões necróticas podem observar-se, caso o estado de avançada autólise não o impeça, corpos de inclusão virais característicos (Parkinson, 2009b).

O diagnóstico pode ser realizado através de análises de imunofluorescência ou de análises imunohistoquímicas dos órgãos fetais (Cabell, 2007).

2.6.12. Infecção pelo vírus da Língua azul

O vírus da língua azul é um orbivírus pertencente à família Reoviridae, transmitido por *Culicoides sp.*, um insecto hematófago (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007c). Existem vários serótipos do vírus, sendo conhecidos, até à data, 24 serótipos. Na Europa, nos últimos 10 anos, surgiram novos serótipos do vírus (os serótipos 1, 2, 4, 8, 9 e 16),

constituindo o serótipo 8 o de maior patogenicidade para os bovinos (Schwartz-Cornil *et al*, 2008). A principal espécie de insecto envolvida é *C. imicola* (Parkinson, 2009b). Pensa-se que o *Ornithodoros coriaceus*, o *Aedes lineatopennis* e o *Anopheles vagus* também tenham capacidade de transmissão do vírus (Radostits *et al*, 2007c).

Os bovinos são o reservatório natural deste vírus (Kelling, 2007), pois a infecção destes animais nas zonas endémicas é bastante comum e inaparente. Depois de infectados, estes podem ficar virémicos durante várias semanas, servindo de fonte de infecção para os *Culicoides* (Barrat-Boyce & MacLachlan, 1995).

Quando a infecção acontece durante os primeiros 100 dias de gestação, pode ocorrer morte embrionária ou aborto. Se a infecção ocorrer entre os 75 e os 100 dias, podem nascer nados-mortos, vitelos fracos ou com anomalias cerebrais. Normalmente, se ocorrer depois dos 150 dias, não provoca efeitos adversos nos fetos (Kelling, 2007; Givens & Marley, 2008).

O diagnóstico pode ser realizado através de isolamento viral, detecção do antígeno viral ou dos seus ácidos nucleicos, por PCR, ou ainda por serologia, através de testes de fixação do complemento, análises ELISA e imunodifusão em ágar-gel (AGID). As amostras para virologia incluem os pulmões, o baço, constituintes do sistema nervoso central (SNC) e fluidos torácicos fetais (Radostits *et al*, 2007c).

2.6.13. Infecção por *Tritrichomonas foetus*

A *T. foetus* é um protozoário flagelado. Este parasita causa doença venérea, sendo mais frequentemente associado a morte embrionária precoce do que a abortos (Anderson, 2007).

A doença é transmitida às vacas durante o coito, por machos portadores assintomáticos (estes são infectados através de fêmeas infectadas). O microorganismo habita as criptas e pregas do tegumento peniano, assim como a mucosa prepucial, pelo que os machos mais jovens são menos susceptíveis de se tornarem portadores persistentes. O uso de inseminação artificial apenas controla a tricomonose caso o sémen utilizado seja proveniente de machos livres de doença. Com menor frequência, as vacas podem infectar-se através de espéculos vaginais ou outros materiais contaminados usados em reprodução (Parkinson, 2009b).

Este protozoário coloniza o útero, cérvix e vagina, causando vaginite e endometrite catarral, edema da vulva, do tecido perivaginal e da parede uterina. Os animais afectados, normalmente, apresentam corrimento vulvar intermitente (Parkinson, 2009b).

Esta doença não afecta a fertilização e, frequentemente, a morte embrionária ocorre após o reconhecimento materno da gestação, pelo que os intervalos entre estros se encontram

irregularmente aumentados. A maioria das perdas de gestação ocorrem entre os 30 e os 50 dias de gestação. A fertilidade é restabelecida depois do desenvolvimento de imunidade ao parasita, no entanto, este é um processo demorado, pelo que muitas vacas sofrem sucessivas mortes embrionárias até conseguirem completar uma gestação. No fim da gestação, uma vez que a vaca já não está imune, pode ser re-infectada por um macho portador da doença (Parkinson, 2009b). Normalmente, a infecção é debelada em cerca de 90 dias (Givens & Marley, 2008).

Os abortos, frequentemente, ocorrem entre o segundo e o quarto mês de gestação, embora alguns possam ocorrer depois deste período (Parkinson, 2009b).

As vacas infectadas podem apresentar diversos quadros clínicos, ou seja, podem ficar gestantes e conceber um vitelo saudável, sem apresentarem sinais de infecção; podem fazer vários retornos ao estro, regulares ou não, sem mostrarem sinais evidentes de infecção; podem não ficar gestantes e desenvolver edema do endométrio; podem conseguir ficar gestantes, mas abortar entre os 2 e os 4 meses de gestação; e podem ainda desenvolver piómetra, ficando acíclicas (Parkinson, 2009b).

Normalmente, ocorre placentite com edema da placenta; o estado de autólise fetal é variável (Anderson, 2007).

O diagnóstico pode ser feito através da confirmação da presença de tricomonas no pús uterino, corrimentos vaginais, muco cervical, placenta ou fetos abortados. No entanto, o facto de não ser possível conseguir encontrar o microorganismo não é razão suficiente para rejeitar este diagnóstico, uma vez que, após a morte, o agente degenera rapidamente. Podem fazer-se isolamentos a partir de culturas com meios específicos para este microorganismo. Actualmente, este diagnóstico também pode ser realizado por PCR (Parkinson, 2009b).

2.6.14. Sarcocistose

O género *Sarcocystis* é um agente zoonótico, protozoário intracelular obrigatório, cujo ciclo de vida compreende dois hospedeiros. Os estadios assexuados desenvolvem-se apenas no hospedeiro intermediário, enquanto os sexuados se desenvolvem no hospedeiro definitivo. Este género compreende mais de 100 espécies, sendo que a maioria destas apresentam maior especificidade para o hospedeiro intermediário do que para o definitivo (Dubey & Lindsay, 2006).

Os bovinos são o hospedeiro intermediário de três espécies: *Sarcocystis cruzi*, *S. hominis* e *S. hirsuta* (os hospedeiros definitivos destas espécies são o cão, os primatas e o gato,

respectivamente). Os hospedeiros definitivos infectam-se pela ingestão de tecidos do hospedeiro intermediário contendo quistos com cistozoítos/bradizoítos (forma infectante). No intestino delgado, estas formas dão origem aos oocistos. Os bovinos infectam-se pela ingestão de esporocistos, libertados nas fezes do hospedeiro definitivo (Garry, 2008).

Normalmente, o parasita *Sarcocystis* não é patogénico para o hospedeiro definitivo, e algumas espécies também não o são para o hospedeiro intermediário. Os hospedeiros intermediários podem apresentar duas formas clínicas: a aguda e a crónica. Na forma aguda, três a quatro semanas depois da infecção, os animais apresentam febre, anorexia, anemia, emaciação e alopecia, podendo alguns destes sucumbir. As fêmeas gestantes podem abortar (Dubey & Lindsay, 2006). Esta infecção é mais severa nos vitelos ou nos bovinos adultos que são subitamente expostos a números muito elevados de oocistos infectantes. Quando a infecção é severa, ocorre vasculite e hemólise extravascular, o que leva à anemia (Garry, 2008). Na forma crónica, os animais apresentam-se clinicamente normais e as lesões estão restritas ao músculo, consistindo em miosite não supurativa e na degeneração dos sarcocistos (Dubey & Lindsay, 2006). Os quistos tecidulares podem ser encontrados no músculo esquelético e cardíaco dos bovinos (Garry, 2008).

Infecções experimentais por *Sarcocystis* sp. revelam que o parasita é responsável por causar abortos no segundo trimestre de gestação, podendo estes ocorrer devido a infecção fetal ou a stress materno (Garry, 2008).

2.6.15. Aborto micótico bovino

Os fungos responsáveis por causar aborto em bovinos são saprófitas ubiqüitários. O mais frequentemente isolado é a espécie *Aspergillus fumigatus*. No entanto, são isolados outros, como *Mortierella wolfii*, *Aspergillus* spp, *Absidia* spp, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii*, algumas espécies de *Penicillium*, *Candida* e *Torulopsis* (Givens & Marley, 2008). A predominância destes fungos está dependente da área geográfica em que as explorações se encontram (Walker, 2007).

Os abortos são esporádicos, ocorrendo, normalmente, nas épocas em que os animais se encontram estabulados. Os agentes micóticos podem entrar por via respiratória ou gastrointestinal (Givens & Marley, 2008), sendo pouco comuns as infecções ascendentes a partir do tracto genital. Normalmente, os abortos ocorrem entre o sexto e o oitavo mês de gestação, mas podem ocorrer mais precocemente (Walker, 2007). É comum ocorrer retenção placentária. As vacas infectadas com *Mortierella wolfii* podem apresentar pneumonia após o

aborto e morrerem em pouco tempo (Givens & Marley, 2008), no entanto, normalmente, as vacas não mostram quaisquer sinais clínicos (Cabell, 2007).

Geralmente, ocorre placentite severa, envolvendo as áreas cotiledonar e intercotiledonar, que surgem espessadas. Os cotilédones podem apresentar enfartos hemorrágicos, com tecido caruncular aderente. Histologicamente, pode observar-se inflamação supurativa, necrose e vasculite com trombose. Normalmente, os fetos encontram-se pouco autolisados, principalmente quando há envolvimento do *A. fumigatus*. Alguns dos fetos abortados podem apresentar placas circunscritas na pele (Anderson, 2007).

As lesões na placenta e nos fetos abortados muitas vezes são bastante características de aborto micótico, porém, uma vez que podem ser semelhantes às lesões causadas pelo *B. licheniformis* ou pela *C. abortus*, são necessárias análises laboratoriais (Cabell, 2007). O diagnóstico presuntivo pode ser feito a partir da observação microscópica de raspagens da placenta ou de lesões cutâneas, ou ainda do conteúdo abomasal, depois da sua digestão com uma solução de hidróxido de potássio a 10% (KOH) (Anderson, 2007). Idealmente, a totalidade da placenta deve ser enviada para laboratório. Também não se deve analisar apenas o feto, pois este nem sempre está envolvido, o que pode levar a um falso diagnóstico negativo. As características morfológicas microscópicas dos fungos ajudam na identificação do grupo de agentes envolvidos (Walker, 2007). É necessário ter em consideração que a demonstração microscópica da presença do fungo ou o seu isolamento devem ser cuidadosamente interpretados, uma vez que estes fungos são ubiquitários, podendo a sua presença ser apenas resultado da contaminação ambiental (Anderson, 2007).

2.6.16. Neosporose bovina

2.6.16.1. Nota histórica

Actualmente, a neosporose é reconhecida em todo o mundo como uma importante causa de aborto bovino (Parkinson, 2009b).

A espécie *N. caninum* foi pela primeira vez descrita em cães com encefalomielite severa e sem anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em 1984 [Bjerkås, Mohn e Presthus (1984), citados por Dubey e colegas (2002)]. Assim, até 1988, este parasita era confundido com o *Toxoplasma gondii*. Só neste ano, Dubey, Carpenter, Speer, Topper e Uggla, isolaram e caracterizaram o parasita, atribuindo-lhe o nome de *Neospora caninum*. O seu estudo baseou-

se na análise de cortes histológicos e de histórias clínicas de 23 cães cujo diagnóstico era de toxoplasmose. O parasita *Toxoplasma gondii* foi identificado em 13 destes animais e *Neospora caninum* em 10. Os autores concluíram do seu estudo que este parasita apresentava uma estrutura diferente da de *T. gondii* e que não existia reacção imunitária cruzada entre os dois parasitas. Apesar de serem clinicamente semelhantes, a neosporose caracterizava-se por sinais neurológicos e de miosite mais severos, coincidentes com as lesões histológicas encontradas. Estes autores colocaram também a hipótese da existência de infecção congénita. Os quistos encontravam-se no citoplasma das células, não existindo um vacúolo parasitóforo, e apresentavam várias róptrias (o *T. gondii* encontra-se separada da célula hospedeira por um vacúolo parasitóforo e apresenta poucas róptrias). Assim, os autores concluíram que estavam perante um novo género e uma nova espécie, diferente de todas as coccídeas conhecidas até então (Dubey *et al*, 1988). A primeira descrição de neospora pode ser resumida como sendo,

“ (...) um organismo intracelular do tecido neuronal e de outras células do corpo, que se multiplica por endodiogenia, não tem vacúolo parasitóforo e apresenta numerosas róptrias; os seus taquizoítos apresentam as dimensões 4 a 7 µm x 1.5 a 5 µm; os quistos teciduais são encontrados nos tecidos neuronais e a sua parede apresenta 1 a 4 µm de espessura; os bradizoítos são PAS (Reacção de Ácido Periódico de Schiff) positivos (Dubey *et al*, 1988, p. 1285, tradução livre). ”

2.6.16.2. Agente etiológico e ciclo de vida

A espécie *N. caninum* é um protozoário intracelular, pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae e género *Neospora* (McAllister *et al*, 1998a). Este protozoário encontra-se estreitamente relacionado com a espécie *T. gondii*, no entanto, Dubey e co-autores (2002), com base no estudo realizado em 1988, diferenciam *Neospora caninum* de *T. gondii*, tendo em conta o quadro clínico dos animais (a paralisia dos membros posteriores não é observada nos animais com toxoplasmose), a morfologia dos quistos tecidulares (os quistos tecidulares dos protozoários são morfologicamente distintos), a serologia e as análises imunohistoquímicas (os animais não apresentavam anticorpos e os parasitas não reagem aos anticorpos de *T. gondii* nas análises imunohistoquímicas). O parasita *N. caninum* é responsável por causar doença em cães e abortos em bovinos. Ocasionalmente, também pode causar abortos em caprinos, ovinos, veados, rinocerontes, lamas e alpacas (Dubey, Buxton & Wouda, 2006). A outra espécie de *Neospora*, *N. hughesi*, tem sido associada a doença em equinos (Dubey *et al*, 2002). A espécie *N. caninum* foi já isolada em numerosos animais, tendo sido também reportada a existência de anticorpos anti-neospora em vários animais de sangue quente

(Dubey *et al*, 2006), assim como em humanos, embora os níveis destes tenham sido baixos, indicando apenas exposição ao agente (Tranas, Heinzen, Weiss & McAllister, 1999), pelo que, actualmente, não existe evidência de que a neosporose se trate de uma zoonose. Diferentes estudos serológicos permitiram concluir que muitos animais domésticos, silvestres e zoológicos terão sido expostos ao agente (Dubey *et al*, 2007).

O ciclo de vida do protozoário é heteroxeno, necessitando de dois hospedeiros para completar o seu ciclo (Dubey *et al*, 2006). Como hospedeiros definitivos, conhecem-se apenas os cães (*Canis familiaris*) (McAllister *et al.*, 1998a; Lindsay, Dubey & Duncan, 1999) e os coiotes (*Canis latrans*) (Gondim, McAllister, Pitt & Zemlicka, 2004). Como hospedeiros intermediários são conhecidos os cães (Dubey, 2004) e os bovinos (Dubey, 1999b), assim como os ovinos [Dubey, Hartley, Lindsay & Topper, 1990, citado por Dubey (2004)], os caprinos (Barr, Anderson, Woods, Dubey & Conrad, 1992), os cavalos [Dubey & Porterfield, 1990, citado por Dubey (2004)], os veados [Dubey *et al*, 1996, citado por Dubey (2004)] e os búfalos (*Bubalus bubalis*) (Guarino, Fusco, Savini, Francesco & Cringoli, 2000).

Os isolados de neospora dos diferentes hospedeiros são geneticamente similares, embora existam várias estirpes [Regidor-Cerrillo, Pedraza-Díaz, Gómez-Bautista e Ortega-Mora (2006), citado por Dubey e co-autores (2007)].

O seu ciclo não é inteiramente compreendido. Até à data, conhecem-se três estádios infectantes, os taquizoítos, os bradizoítos e os esporozoítos. Os dois primeiros estádios estão presentes tanto nos hospedeiros definitivos como nos intermediários, e tratam-se de estádios intracelulares. Os oocistos, que contêm os esporozoítos, são apenas excretados nas fezes dos hospedeiros definitivos (Dubey *et al*, 2006). Os taquizoítos apresentam uma forma ovóide, semilunar ou globular, medindo entre 3-7 x 1-5 µm, dependendo da fase de divisão em que se encontram. Esta forma infectante pode ser encontrada em diferentes tipos celulares (Dubey *et al*, 2002), como no tecido nervoso, células do endotélio vascular, miócitos, hepatócitos, células renais, macrófagos alveolares e trofoblastos placentários (Dubey *et al*, 2006), e cada célula pode conter vários taquizoítos. Sabe-se hoje que estes se encontram no citoplasma da célula hospedeira, no interior de um vacúolo parasitóforo (este não foi visualizado por Dubey e co-autores, em 1988) e que cada taquizoíto pode conter 6 a 16 róprias. Os taquizoítos contêm a maioria dos organelos encontrados nos merozoítos das coccídeas, embora os seus microporos não sejam facilmente detectáveis (Dubey *et al*, 2002). Os taquizoítos apresentam um núcleo central e poucos grânulos de amilopectina, contrariamente aos bradizoítos. Estas formas infectantes são a forma de replicação rápida do parasita (Dubey *et al*, 2006).

Os bradizoítos encontram-se no interior dos quistos tecidulares (Dubey *et al*, 2002), tratando-se de formas de replicação lenta (Dubey *et al*, 2006)). Estes quistos são encontrados primariamente no tecido nervoso (Dubey *et al*, 2002) e nos músculos esqueléticos (Peters, Lütkefels, Heckeroth & Schares, 2001) do hospedeiro intermediário, e a sua parede apresenta até 4 µm de espessura (Dubey *et al*, 2002), dependendo as suas dimensões do número de bradizoítos que apresenta (Dubey *et al*, 2006). Nestas formas não são observados septos nem paredes quísticas secundárias. Os bradizoítos medem aproximadamente 6,5 x 1,5 µm, apresentam uma forma alongada (Dubey *et al*, 2004), um núcleo subterminal e 6-12 róptrias (Dubey *et al*, 2002), assim como alguns grânulos de amilopectina que se coram de vermelho pela Reacção de Ácido Periódico de Schiff (Dubey *et al*, 2006).

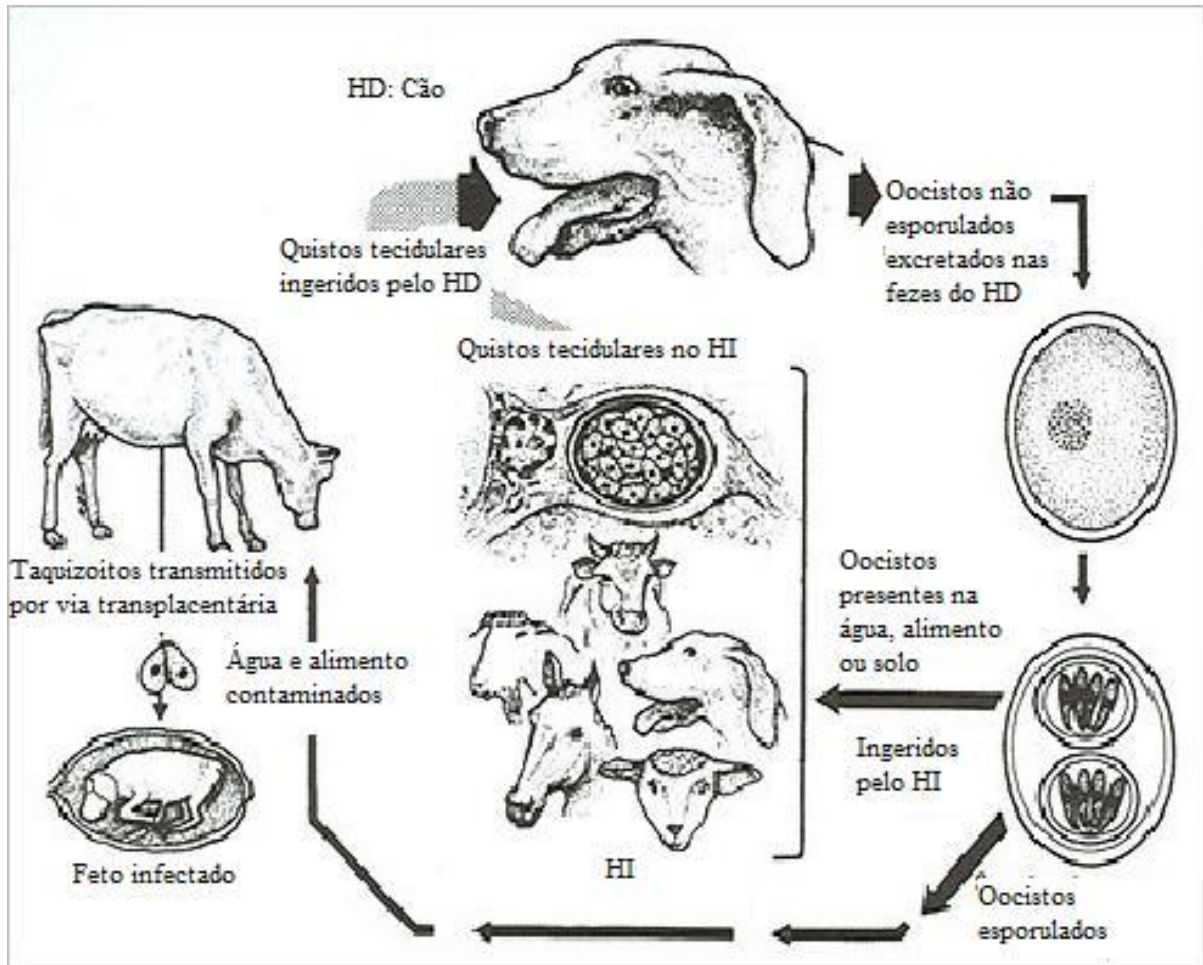
Usando um microscópio de luz, os bradizoítos podem ser diferenciados dos taquizoítos através de análises imunohistoquímicas (Peters *et al*, 2001).

Os quistos nos cães apresentam até 107 µm de diâmetro (Dubey *et al*, 2002), enquanto nos fetos bovinos e nos vitelos congenitamente infectados apresentam até 50 µm de diâmetro e a parede quística não tem mais de 2,5 µm de espessura. Estes são encontrados nos tecidos cerebrais e do cordão espinal (Barr, Anderson, Dubey & Conrad, 1991b; Barr, Conrad, Dubey & Anderson, 1991a). Em 2004, Dubey e co-autores, isolaram, numa ninhada de cães, quistos tecidulares de paredes espessas e de paredes finas. Estes quistos foram identificados como sendo de *N. caninum* através das características morfológicas, PCR, isolamento numa cultura celular e em animais, e ainda por serologia (Dubey *et al*, 2004). Sabe-se que estes quistos podem degenerar e causar reacção no hospedeiro (Dubey, 2004).

Os oocistos apresentam uma dimensão média de 11,7 x 11,3 µm e a sua parede tem 0,6 a 0,8 µm de espessura, sendo desprovida de cor (Dubey *et al*, 2002). Estes são excretados nas fezes dos cães na sua forma não esporulada (Dubey *et al*, 2006). Cada oocisto contém dois esporocistos, com dimensões médias correspondentes a 8,4 x 6,1 µm, cada um destes com quatro esporozoítos (estes são alongados, apresentando uma dimensão de 6,5 x 2,0 µm) e um resíduo (Dubey *et al*, 2002). Sabe-se pouco acerca da frequência com que os cães excretam oocistos e acerca da sua viabilidade no ambiente (Dubey *et al*, 2006), no entanto, uma vez que este parasita é bastante semelhante ao *T. gondii*, pensa-se que as suas resistências no ambiente sejam similares (Dubey, Schares & Ortega-Mora, 2007). Os oocistos podem esporular no ambiente em 24 horas (Lindsay *et al*, 1999). Estes oocistos são morfologicamente indistintos dos dos parasitas *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* e *Hammondia hammondi*, no entanto, estes parasitas são específicos dos gatos (Dubey, 2004).

No hospedeiro definitivo, o parasita, de forma sexuada, origina oocistos. Pensa-se que os estadios de esquizogonia e gametogonia precedam a formação de oocistos, no entanto, isso ainda não foi comprovado. O hospedeiro intermediário ingere os oocistos esporulados (Dubey *et al*, 2006), presentes no alimento ou água contaminados com fezes do hospedeiro definitivo (Dubey *et al*, 2007). Os esporozoítos, existentes nos oocistos esporulados, são libertados no intestino delgado, parasitando o epitélio intestinal, onde se transformam em taquizoítos (Dubey *et al*, 2006; Parkinson, 2009b), sofrendo multiplicação, possivelmente nos linfonodos mesentéricos (Dubey *et al*, 2006). A proliferação dos taquizoítos leva à lise celular, o que permite a infecção de células vizinhas. Os taquizoítos invadem, como referido anteriormente, várias células nucleadas, dividindo-se rapidamente por endodiogenia no interior dos vacúolos parasitóforos. Através do sistema circulatório do hospedeiro, os taquizoítos disseminam-se pelo organismo (Conraths & Gottstein, 2007). Após esta fase de multiplicação rápida, existe uma fase de multiplicação lenta, com formação de bradizoítos (Rodriguez, Moreno & Palomino, 1999). Os quistos tecidulares permitem que o parasita, sob a forma de bradizoitos, fique protegido das reacções do organismo hospedeiro (Conraths & Gottstein, 2007). O ciclo é perpetuado quando ocorre ingestão destes quistos pelo hospedeiro definitivo (Parkinson, 2009b).

Figura 1 - Ciclo de vida de *N. caninum* (Adaptado de Dubey, 2005).



HD: Hospedeiro Definitivo; HI: Hospedeiro Intermediário.

2.6.16.3. Prevalência

A infecção por *N. caninum* foi já reportada em várias partes do globo, incluindo a Austrália, Nova Zelândia, Europa, Coreia, Japão, Tailândia e América (Dubey, 2005). Estudos realizados em diferentes locais demonstram que cerca de 12 a 42% dos fetos abortados apresentam infecção por *N. caninum* (Dubey *et al*, 2007). A prevalência serológica é diferente consoante o país, a região, o tipo de análise serológica usada e o nível de *cut-off* utilizado para determinar a exposição. No entanto, em certas explorações leiteiras, até 87% dos animais são seropositivos (Dubey, 2003). Sabe-se que a neosporose afecta tanto as vacas de aptidão leiteira como as de aptidão cárnica, embora esteja mais estudado nas primeiras (Dubey, 1999a; Dubey *et al*, 2006; Anderson, 2007). Aparentemente, os surtos de neosporose bovina ocorrem com menos frequência nas explorações de carne, provavelmente porque muitas vezes estes animais são criados em pastagens, não sendo usadas muitas rações, que podem estar contaminadas (McAllister, Bjorkman, Anderson-Sprecher & Rogers, 2000). Em Portugal a

neosporose foi diagnosticada pela primeira vez em 2001 e a sua prevalência no país parece ser alta (Canada, Carvalheira, Meireles, Costa & Rocha, 2004). Canada e colegas (2004) realizaram um estudo onde calcularam a prevalência de neosporose em explorações leiteiras, com animais da raça Holstein-Frísia, do centro e norte de Portugal. A prevalência, em animais escolhidos ao acaso em 49 explorações, correspondia a 28% (os títulos de anticorpos foram medidos através do teste de aglutinação directa). Em animais existentes em explorações com história prévia de aborto endémico ou epidémico, esta prevalência era de 46%. Os autores isolaram ainda o parasita em 36% dos fetos abortados analisados. Estes resultados tornam importante a inclusão da neosporose, em Portugal, no diagnóstico diferencial de aborto bovino.

2.6.16.4. Impacto da Neosporose

Esta parasitose é responsável por elevadas perdas económicas relacionadas, principalmente, com a falha reprodutiva. Além dos custos directos decorrentes do aborto, contabilizam-se ainda os custos indirectos associados à assistência veterinária, ao diagnóstico, à necessidade de realizar novas inseminações ou cobrições, à possível diminuição da produção leiteira e ao custo das novilhas de substituição, necessárias quando são refugados os animais seropositivos. O custo do aborto é variável, dependendo da idade e da genética da vaca, assim como da capacidade produtiva da sua descendência. As perdas pós-natais por neosporose são difíceis de avaliar pois, além dos abortos, não existem efeitos óbvios de doença nos animais adultos. Economicamente, a perda mais importante da neosporose encontra-se associada ao refugo dos animais seropositivos (Dubey *et al*, 2007). As perdas económicas por *N. caninum* podem assim dever-se a aborto, reabsorção do conceito, mumificação fetal, nados-mortos, vitelos vivos doentes (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007e), diminuição da produção leiteira nos animais seropositivos que sofreram aborto, e aumento da taxa de refugo (Hobson *et al*, 2002). A reabsorção do conceito manifesta-se por retorno ao serviço, com consequente aumento do tempo até à concepção, ou infertilidade, levando, a longo prazo, a uma diminuição da produção leiteira. O aborto resulta na perda do valor do vitelo e no aumento do intervalo entre partos. Ao aumentar o intervalo entre partos, reduz o número de lactações de cada animal, individualmente, durante um determinado período de tempo. Por outro lado, pode aumentar ou prolongar a lactação em que ocorre. Uma vez que as vacas ficam persistentemente infectadas, transmitindo o parasita à descendência, o seu valor comercial diminui bastante (Trees, Davison, Innes & Wastling, 1999).

2.6.16.5. Transmissão

Sabe-se actualmente que a presença de quistos de *N. caninum* nos músculos esqueléticos do hospedeiro intermediário é de grande importância para a epidemiologia do neospora (Peters *et al*, 2001), pois é através da ingestão destes que o hospedeiro definitivo (carnívoro) se infecta (Dubey *et al*, 2006). Existe também alguma evidência de que a placenta de bovinos naturalmente infectados pode ser uma fonte de infecção para os cães (Dubey *et al*, 2006). Os hospedeiros definitivos também se podem infectar pela ingestão de leite ou colostro infectados (Hall, Reichel & Ellis, 2005).

A transmissão nos bovinos pode ocorrer de forma vertical ou horizontal. Este protozoário é um dos parasitas onde a transmissão vertical/transplacentária ocorre de forma mais eficiente (Dubey *et al*, 2006), havendo 95,2 % de probabilidade desta ocorrer (Davison, Otter & Trees, 1999a). A transmissão transplacentária pode ser avaliada através da comparação da seroprevalência entre as vacas e a sua descendência. Uma vez que a placenta dos bovinos não permite a passagem de anticorpos da vaca para o feto, a detecção de anticorpos específicos no soro pré-colostral indica produção de anticorpos pelo próprio feto, no entanto, o facto de não se encontrarem estes anticorpos não indica, necessariamente, que não houve infecção fetal, pois pode não ter havido tempo suficiente para a sua produção, caso a infecção tenha ocorrido tardiamente na gestação (Dubey *et al*, 2007). Trees e Williams (2005), sugeriram os termos transmissão transplacentária endógena e exógena, uma vez que se tratam de duas situações distintas. Assim, a infecção transplacentária endógena refere-se à infecção fetal a partir de um agente que existe cronicamente na mãe, enquanto a exógena se refere à infecção fetal resultante da exposição materna ao agente, aquando da gestação. Estes autores concluíram que a prevalência da infecção fetal é maior quando a transmissão por via transplacentária endógena é mais importante, isto é, se apenas ocorrer transmissão transplacentária exógena, a prevalência de infecção fetal será baixa (Trees & Williams, 2005).

A outra via de transmissão é a horizontal, isto é, através da ingestão de oocistos esporulados. Pensa-se que não seja a possível a transmissão vaca-a-vaca (Dubey *et al*, 2006; Dubey *et al*, 2007). Os vitelos podem ficar infectados ao ingerirem leite contaminado, porém, esta não é considerada uma via importante de transmissão (Davison *et al*, 2001). Actualmente, não existem dados que sustentem que o protozoário se encontre, de forma viável, nas excreções ou secreções dos bovinos adultos assintomáticos (Dubey *et al*, 2007). Sabe-se que a transmissão vertical é responsável por causar abortos esporádicos e pensa-se que os surtos de abortos, ou seja, os abortos epizooticos, sejam devidos a infecção pós-natal (Radostits *et al*, 2007e).

Actualmente, sabe-se que existe um ciclo de transmissão do parasita em ambientes rurais, entre os bovinos e os cães, pois a seroprevalência de anticorpos específicos para *N. caninum* é significativamente mais alta em cães existentes nas explorações, comparativamente aos cães urbanos (Antony & Williamson, 2003, citados por Radostits *et al*, 2007e).

Hall e colegas (2005), efectuaram um estudo onde analisaram a taxa de abortos de uma exploração australiana, realizando também análises serológicas. Os autores concluíram que existia uma forte associação entre as vacas seropositivas e os abortos. Através da análise das relações familiares, foi possível concluir que 74% das vacas seropositivas se encontravam relacionadas entre si, o que indica infecção endémica. Dos animais analisados, 15% eram animais seropositivos nascidos de animais seronegativos, o que indica a existência de infecção pós-natal (através da ingestão de oocistos, de tecidos fetais ou de animais infectados ou ainda pela ingestão de leite ou colostro infectados) (Hall *et al*, 2005).

A via venérea parece ser pouco provável. Apesar de, em 2005, Ferre e colegas terem demonstrado a presença de DNA do parasita no sémen e no sangue de machos naturalmente infectados, sugerindo que a via venérea poderia ser importante, um outro estudo demonstrou a presença de DNA de *N. caninum* no sémen de machos bovinos infectados experimentalmente. Neste último, verificou-se que existia uma excreção intermitente dos protozoários nos animais cronicamente infectados, no entanto, a sua quantidade, que corresponde ao dobro da excretada pelos animais infectados naturalmente, não foi suficiente para isolar o agente em modelos animais (ratos), o que indica que esta será uma via de transmissão menor (Serrano-Martínez *et al*, 2007).

2.6.16.6. Apresentação clínica

O aborto é a principal manifestação clínica de neosporose em vacas adultas, não existindo quaisquer sinais de doença nas vacas que abortam (Anderson, 2007). A infecção pode provocar aborto, reabsorção do concepto ou mumificação, podendo ainda levar ao nascimento de nados-mortos, de vitelos vivos, mas doentes (Radostits *et al*, 2007e), ou ainda, e mais frequentemente (Moore, Odeón & Campero, 2001), ao nascimento de vitelos cronicamente infectados mas clinicamente normais (Radostits *et al*, 2007e). Normalmente, não se verifica a ocorrência de retenção placentária como sequela do aborto (Anderson, 2007). Os abortos podem ocorrer desde os três meses de gestação até ao seu termo, no entanto, a maioria destes ocorrem entre o quinto e o sexto mês (Dubey & Lindsay, 2006).

As vacas infectadas, normalmente, apresentam, na primeira lactação, um decréscimo da produção leiteira (produzem menos um litro por vaca por dia, relativamente às vacas sem infecção), apresentando maior risco de aborto e também maior probabilidade de serem refugadas (Radostits *et al*, 2007e). Hobson e colegas (2002) concluíram que nas explorações com problemas de abortos, as vacas seropositivas para *N. caninum* apresentavam uma menor produção leiteira. Pelo contrário, nas explorações sem abortos, a produção leiteira era semelhante tanto nas vacas seropositivas como nas seronegativas.

Nas vacas de aptidão cárneas, além do risco aumentado de aborto, muitas vezes os vitelos nascem prematuramente, com baixo peso corporal ao nascimento (Radostits *et al*, 2007e).

Os sinais clínicos apenas foram reportados em vitelos até dois meses de idade (Dubey, 2003), podendo estes apresentar sinais neurológicos e baixo peso corporal. Muitas vezes, estes animais são incapazes de se colocar em estação (os seus membros anteriores e posteriores podem apresentar-se flectidos ou hiperextendidos). Podem ainda apresentar ataxia, diminuição dos reflexos patelares, perda de propriocepção consciente, exoftalmia ou assimetria ocular. A infecção por *N. caninum* também pode originar hidrocefalia e estreitamento do cordão espinal (Dubey, 1999b; Dubey, 2003).

Os vitelos nascidos de vacas congenitamente infectadas, frequentemente, nascem persistentemente infectados. Estes animais, congenitamente infectados, apresentam maior risco de aborto, particularmente na sua primeira gestação. Seguidamente, estes animais exibem maior tendência para originar vitelos também congenitamente infectados do que para abortar. Os animais infectados por transmissão horizontal podem abortar, produzir vitelos sem infecção ou vitelos congenitamente infectados. Isto encontra-se dependente do estado do seu sistema imunitário e da fase de gestação em que se encontram quando são infectados (Parkinson, 2009b).

Sabe-se também que uma pequena proporção dos animais pode fazer abortos repetidos (Anderson *et al*, 1995; Pabón *et al*, 2007). Do seu estudo, em 1997, Thurmond e Hietala concluíram que as vacas infectadas com história prévia de aborto apresentavam maior risco de abortar novamente, comparativamente aos animais infectados sem história de aborto. Os autores apresentam como justificação o facto de estes animais apresentarem uma resposta imunitária inapropriada. Estes autores concluíram ainda que o risco de aborto associado a *N. caninum* diminuía em cada gestação subsequente, sendo que em cada gestação o risco de aborto inicia-se mais tardiamente e estende-se por um período de tempo mais curto. Este facto pode estar relacionado com o facto de vacas com tendência para abortar e com menor

produção leiteira devido à infecção, serem selectivamente refugadas (Thurmond & Hietala, 1997).

Os abortos podem apresentar um padrão epidémico ou endémico (Dubey *et al*, 2007), sendo este último mais frequente (Anderson, 2007). O padrão de abortos é considerado epidémico se 10% ou mais dos animais em risco abortarem em seis a oito semanas (Dubey & Lindsay, 2006). Os abortos são considerados como tendo um padrão endémico se mais de 5% dos animais da exploração abortarem durante vários anos (Anderson, 2007). Estudos referem que alguns anos após um surto epidémico, a mesma exploração pode sofrer um padrão de abortos endémico (McAllister *et al*, 2000; Bjorkman *et al*, 2003). Pensa-se que os surtos epizooticos ocorram por infecção primária dos animais, isto é, por ingestão de alimento ou água contaminados com oocistos (McAllister *et al*, 2000), ou por exposição dos animais a outro agente infeccioso, como VBVD, ou ainda por exposição a um factor capaz de provocar imunossupressão [Antony e Williamson (2003), citados por Parkison, 2009b], havendo por isso uma exposição ao agente bem demarcada no tempo, originando infecção fetal por transmissão transplacentária exógena (Dubey *et al*, 2007). Os abortos endémicos ocorrem com maior frequência nas vacas infectadas congenitamente (Radostits *et al*, 2007e), existindo evidências, baseadas em análises serológicas, de que os abortos repetidos são causados pela re-activação de uma infecção latente, embora seja possível ocorrer uma nova infecção (Abbitt & Radse, 2007).

2.6.16.7. Lesões

Os fetos abortados, normalmente, encontram-se autolisados, e a mumificação fetal tem sido associada aos surtos de *N. caninum*. Frequentemente, os fetos apresentam uma acumulação de fluído serosanguinolento nas cavidades corporais, focos esbranquiçados nos músculos esqueléticos e coração (Anderson, 2007). As lesões mais frequentes são encontradas no cérebro, sendo a encefalite a lesão predominante, caracterizada por necrose e inflamação não supurativa (Parkinson, 2009b). Por vezes, também se observa meningite moderada (Dubey *et al*, 2006). Frequentemente, pode também ser identificada epicardite não supurativa e/ou miocardite e miosite. O fígado muitas vezes exhibe hepatite com focos de necrose. Nos pulmões e rins observam-se infiltrados intersticiais não supurativos (Anderson, 2007). A placenta apresenta necrose das vilosidades, com acumulação de soro entre as vilosidades fetais e o septo maternal, e inflamação não supurativa dos septos maternos (Dubey *et al*, 2006), podendo a placentite ser mais ou menos severa (Anderson, 2007).

2.6.16.8. Patogénese/relação parasita-hospedeiro

A patogénese deste parasita ainda não é inteiramente conhecida, substando ainda diversas dúvidas.

Actualmente, é sabido que a imunidade celular apresenta uma grande importância na protecção contra *N. caninum*. Aparentemente, as citocinas pró-inflamatórias e as respostas imunitárias do tipo Th1 desempenham um papel importante nesta protecção. Durante a gestação ocorre imunomodulação, pelo que o sistema imunitário da vaca pode não ter capacidade para combater esta infecção (Innes *et al*, 2005). Os níveis de anticorpos específicos para *N. caninum* nos animais gestantes não são constantes durante a totalidade da gestação, havendo um aumento dos seus níveis a meio da gestação, que se correlaciona com o aborto. Caso o aumento dos níveis de anticorpos ocorra no fim da gestação não ocorrem perdas de gestação (Guy *et al*, 2001). Innes e colegas (2001) concluíram que a meio da gestação a proliferação celular específica e a resposta do interferão γ (IFN γ) se encontram diminuídas, comparativamente ao início da gestação e à fase não gestante. O facto da resposta do IFN γ se encontrar diminuída pode permitir a recrudescência de *N. caninum* nos animais congenitamente infectados (Innes *et al*, 2005). Os picos de resposta celular ao parasita correlacionam-se com os níveis de P₄ séricos, ou seja, estão mais altos quando os níveis de P₄ estão mais baixos, isto é, na fase inicial e terminal da gestação. Esta imunomodulação durante a gestação, principalmente a alteração na resposta do IFN γ , pode influenciar a recrudescência da infecção persistente, fazendo com que os bradizoítos se tornem activos, causando parasitémia, com consequente infecção placentária e fetal (Innes *et al*, 2001). Guy e colegas (2001), realizaram também um estudo em vacas gestantes cronicamente infectadas. Os autores observaram que o aumento dos níveis de anticorpos maternos se encontrava associado com a recrudescência da parasitose, e que os níveis médios de IFN γ eram mais altos nas vacas que não infectaram os seus fetos. A partir deste estudo, os autores puderam concluir que a medição dos níveis de anticorpos maternos numa fase inicial da gestação não pode ser usada para prever o resultado da gestação, no entanto, níveis de anticorpos altos na segunda metade da gestação encontram-se associados ao nascimento de vitelos congenitamente infectados.

Sabe-se também que a resposta imunitária da vaca pode, só por si, comprometer a gestação (Innes *et al*, 2005). Assim, a fetopatia pode ocorrer primariamente por lesão directa do feto, devido à multiplicação do parasita nos tecidos, ou pode ocorrer devido a nutrição ou oxigenação fetal insuficiente, secundário a placentopatia. Também pode ocorrer expulsão fetal devido à acção do sistema imunitário materno, por libertação de citocinas pró-

inflamatórias na placenta. O aborto tardio ou o nascimento prematuro de vitelos infectados pode ser explicado através da insuficiência placentária. Neste caso, o feto entra em anóxia, havendo libertação fetal de hormona adrenocorticotrófica (ACTH), com subsequente libertação de cortisol fetal. O aumento no nível de cortisol estimula a produção de estrogénio e PGF_{2α} pela placenta, resultando em luteólise, com consequente decréscimo da P₄ (Dubey *et al*, 2006).

Também é sabido que, no início da gestação, o feto não tem o sistema imunitário suficientemente desenvolvido para contrariar a infecção, enquanto um feto mais desenvolvido (Dubey *et al*, 2006), aos 4 a 6 meses de gestação, começa a desenvolver a sua capacidade imunitária (Innes *et al*, 2005), conseguindo limitar o crescimento do parasita e o desenvolvimento de lesões, favorecendo o desenvolvimento de quistos teciduais e a infecção persistente (Dubey *et al*, 2006). Como referido anteriormente, a maioria das infecções transplacentárias resulta no nascimento de vitelos clinicamente saudáveis mas infectados, o que permite concluir que a transmissão ocorre, normalmente, numa fase tardia da gestação (Innes *et al*, 2005).

Estudos experimentais indicam que as consequências fetais são mais severas quanto mais precocemente na gestação ocorrer a infecção fetal (Maley *et al*, 2003; Macaldowie *et al*, 2004, citados por Innes *et al*, 2005). Em 2004, Macaldowie e co-autores (citado por Innes *et al*, 2005), inocularam com *N. caninum* bovinos com 10 semanas de gestação, de modo a caracterizar as lesões causadas. Depois de 14 dias após a inoculação, observou-se necrose focal das vilosidades fetais do placentoma, assim como aglomerados de taquizoítos. O parasita encontrava-se também na circulação fetal, coração, cordão espinal e cérebro. A placenta materna apresentava detritos de células necróticas. Aos 28 dias após a inoculação, ocorreu morte fetal, ocorrendo a separação dos cotilédones das carúnculas (Macaldowie *et al*, 2004, citado por Innes *et al*, 2005). O número de protozoários encontrados nos tecidos fetais é, normalmente, baixo. Os taquizoítos existem em número reduzido devido à patogénese das lesões placentárias, pois o sistema imunitário maternal ou a luteólise induzida pela prostaglandina podem causar contracções uterinas prematuras, com consequente expulsão fetal, sem que tenha existido tempo suficiente para que o parasita se multiplique no feto em grande escala (Dubey *et al*, 2006). Assim, os fetos infectados precocemente na gestação estão mais susceptíveis ao aborto. Pelo contrário, quando a recrudescência ocorre numa fase tardia, os fetos sobrevivem, nascendo congenitamente infectados (Guy *et al*, 2001; Williams *et al*, 2003). Outro estudo indica que a neosporose crónica não tem efeitos negativos no início do período fetal, sendo abortiva apenas a partir dos 90 dias de gestação. É durante o segundo

trimestre de gestação que o parasita *N. caninum* apresenta maiores taxas de aborto em vacas cronicamente infectadas (López-Gatius, Pabón & Almería, 2004).

Experimentalmente, provou-se que se os animais contactassem com o parasita antes da gestação, mais tarde, quando contactassem novamente com o agente, o seu sistema imunitário impediria a ocorrência de infecção fetal exógena (Innes *et al*, 2001; Williams *et al*, 2003). Existem também algumas evidências epidemiológicas de que este fenómeno ocorre em condições de campo (McAllister *et al*, 2000), no entanto, não existe evidência, até à data, da existência de protecção imunológica para a transmissão transplacentária endógena (Trees & Williams, 2005). Provavelmente, as vacas ficam persistentemente infectadas, transmitindo o parasita nas gestações consecutivas (Fioretti, Pasquai, Diaferia, Mangili & Rosignoli, 2003). Outro estudo conclui que a taxa de infecção fetal por via transplacentária endógena pode diminuir nas gestações seguintes, o que pode indicar alguma imunidade (Dijkstra, Barkema, Eysker, Beiboer & Wouda, 2003). De acordo com o estudo anterior, Dubey e colegas, em 2006, sugerem que as taxas de transmissão placentária endógena sofrem um descréscimo com o aumento do número de partos dos animais, sugerindo que a imunidade existente nos animais congenitamente infectados é efectiva, mas não na sua totalidade (Dubey *et al*, 2006).

A idade da vaca, o número de lactações, a história clínica de abortos (Dubey, 2003; Radostits *et al*, 2007e), o sexo dos vitelos e o tempo de gestação (Radostits *et al*, 2007e), geralmente, não afectam a taxa de infecção congénita, no entanto, existem alguns estudos que indicam que a transmissão transplacentária é mais eficiente nas vacas mais novas relativamente aos animais mais velhos (Dubey, 2003). Outro estudo demonstrou também que as vacas com história prévia de aborto causado por *N. caninum* têm um risco maior de abortar novamente na gestação seguinte (Thurmond & Hietala, 1997).

A afinidade funcional das imunoglobulinas G para *N. caninum* permitem estimar se a infecção é crónica ou aguda (nas infecções agudas esta afinidade funcional é menor) (Bjorkman *et al*, 2003). McAllister e colegas (2000) sugeriram, no estudo que realizaram em explorações de bovinos com aptidão cárneo, que os animais com altos níveis de afinidade funcional, medidos através de análises ELISA, apresentavam melhores índices reprodutivos durante o surto de neosporose, comparativamente com os animais que tinha baixos níveis desta afinidade. Os autores do estudo concluíram ainda que se a prevalência de infecção numa exploração diminuir, a susceptibilidade desta a um surto epidémico de neosporose pode aumentar. Estes resultados indicam que haja uma certa protecção imunitária, como já tinha sido referido anteriormente (McAllister *et al*, 2000). Esta afinidade também permite verificar se na

exploração ocorre transmissão horizontal, estando esta presente quando apenas alguns animais apresentam níveis baixos de afinidade funcional (Bjorkman *et al*, 2003).

2.6.16.9. Factores de risco

Teoricamente, existem dois tipos de risco, o risco do animal ficar infectado e o risco de um animal infectado abortar (Hemphill *et al*, 2000). Estes riscos encontram-se positivamente associados entre si, no entanto, são influenciados de diferentes modos (Dubey *et al*, 2007).

Os riscos de infecção são: a idade dos animais, a presença de hospedeiros definitivos, de outros carnívoros e de hospedeiros intermediários; o pasto, a forragem e a água de bebida; a alimentação com leite ou colostro, o manejo dos partos, a densidade populacional dos animais e o tamanho da exploração; a fonte de novilhas de substituição, o clima, o índice de vegetação, a densidade populacional humana, a presença de anticorpos contra outros agentes de infecção, a raça dos animais e o tipo de alojamento. Relativamente ao risco de aborto, estão descritos os seguintes factores: seropositividade individual, seroprevalência na exploração, os factores relacionados com o risco de infecção, os factores associados com a reprodução (história prévia de abortos, taxa de animais que retornam ao estro, retenção placentária, o uso de sêmen de animais de aptidão cárneia para inseminar vacas de aptidão leiteira e o uso de locais de parto para hospitalizar animais doentes) e a presença dos animais nas feiras de gado (Dubey *et al*, 2007).

2.6.16.9.1. Factores de risco de infecção

2.6.16.9.1.1. Idade dos animais

Alguns estudos demonstram que o risco de seropositividade pode aumentar com a idade e paridade (Sanderson, Gay & Baszler, 2000; Rinaldi *et al*, 2005), o que sugere que a transmissão horizontal apresenta alguma importância em determinadas explorações (Dubey *et al*, 2007). Este efeito da idade pode ser explicado pela probabilidade de os animais se infectarem por transmissão horizontal, pois quanto mais viverem, mais oportunidades de infecção existem; assim como pelas diferenças nas taxas de substituição dos animais (Bartels *et al*, 2006). Assim, o refugo não selectivo em explorações com seroprevalências altas pode resultar numa relação positiva entre a idade e a prevalência de infecção (Dubey *et al*, 2007). Em 1998, Waldner, Janzen e Ribble observaram, numa exploração de bovinos de carne situada no Canadá, que a idade se correlacionava negativamente com a seropositividade. Estes

resultados podem ser explicados através do refugo selectivo dos animais seropositivos (Dubey *et al*, 2007).

2.6.16.9.1.2. Presença de hospedeiros definitivos

A presença de cães nas explorações leiteiras (Paré, Fecteau, Fortin & Marsolais, 1998) e o seu número (Paré *et al*, 1998; Rinaldi *et al*, 2005; Corbellini *et al*, 2006b; VanLeeuwen *et al*, 2010) estão positivamente relacionados com o risco de infecção. Dijkstra, Barkema, Hesselink e Wouda (2002b), demonstraram que existe alguma relação entre a seropositividade e a entrada de novos cães na exploração, isto é, os cães recentemente introduzidos representam maior risco de transmissão do que os cães residentes nas explorações em que a neosporose é endémica, pois podem levar à ocorrência de um surto de neosporose. Outro estudo (Godim, McAllister & Gao, 2005), demonstrou que os cães mais novos excretavam uma maior quantidade de oocistos comparativamente aos cães mais velhos. Adicionalmente, os cães presentes nas imediações da exploração também podem representar um factor de risco de infecção (Dubey *et al*, 2007).

2.6.16.9.1.3. Presença de outros carnívoros

McAllister e co-autores (1998b) comprovaram que os gatos não eram hospedeiros definitivos deste parasita, pelo que consideram que a eliminação destes animais das explorações como medida de controlo da neosporose não é justificável. Além disso, em 1999, Ould-Amrouche e colegas (citados por Dubey *et al*, 2007) realizaram um estudo, em que observaram que a presença de gatos tinha um efeito protector. Possivelmente, esta observação encontra-se relacionada com a ausência dos hospedeiros definitivos ou com o facto de os gatos serem predadores de animais que podem funcionar como hospedeiros intermediários, por exemplo os ratos, havendo assim uma redução da frequência de oportunidade para infecção dos hospedeiros definitivos (Dubey *et al*, 2007).

2.6.16.9.1.4. Presença de outros hospedeiros intermediários

A presença de outros hospedeiros intermediários, além dos bovinos, pode representar uma fonte de infecção para os hospedeiros definitivos (Dubey *et al*, 2007). Alguns estudos, como o realizado por Ould-Amrouche e colegas (1999), citados por Dubey e colegas (2007), confirmam esta suposição.

2.6.16.9.1.5. Pasto, forragem e água de bebida

O pasto, a forragem e a água de bebida contaminados com oocistos funcionam como fonte de infecção pós-natal (Dubey *et al*, 2007).

2.6.16.9.1.6. Alimentação dos vitelos com leite ou colostro

Relativamente à alimentação dos vitelos com leite ou colostro, existem ainda grandes dúvidas, não se sabendo, actualmente, se a transmissão lactogénica do agente é ou não possível (Dubey *et al*, 2007). Alguns autores, no entanto, consideram que esta é possível, embora não seja uma via importante de transmissão (Davison *et al*, 2001).

2.6.16.9.1.7. Maneio dos partos

Ould-Amrouche e colegas (1999), citados por Dubey e colegas (2007), observaram no seu estudo que o prolongamento da época de partos reduzia o risco de infecção dos animais da exploração, comparativamente a explorações com épocas curtas (até 3 meses).

2.6.16.9.1.8. Densidade animal e tamanho das explorações

O aumento da densidade animal correlaciona-se positivamente com a prevalência de infecção (Sanderson, Gay & Baszler, 2000; Barling *et al*, 2001). Isto encontra-se relacionado com o facto de, normalmente, serem usados mais concentrados na alimentação destes animais (Dubey *et al*, 2007). Dubey e colegas (2007) consideram que os locais onde este tipo de alimentos são armazenados atraem roedores, que são potenciais presas para os hospedeiros definitivos. Nas explorações com grande área, a seroprevalência é menor (Corbellini *et al*, 2006b). Isso é explicado pelo facto de os cães terem o acesso facilitado a carcaças de bovinos, fetos, placentas e corrimentos uterinos, nas explorações mais pequenas (Dubey *et al*, 2007).

O risco individual de seropositividade é maior nas explorações maiores, ou seja, nas explorações com maior número de animais. Nestas explorações, o risco de seropositividade aumenta porque, normalmente, estas explorações têm mais cães (Otranto *et al*, 2003). Schares e colegas (2004) (citado por Dubey *et al*, 2007) indicam que isto também pode estar relacionado com o facto de, nestas explorações, o risco de adquirir infecção pela compra de novilhas de substituição infectadas estar aumentado. Além disso, as medidas higiénicas que previnem a infecção são mais difíceis de controlar nas grandes explorações. VanLeeuwen e

colegas (2010), pelo contrário, consideram existir uma relação negativa entre o número de vacas existentes na exploração e a seropositividade.

2.6.16.9.1.9. Fonte de novilhas de substituição

Se a seroprevalência for mais elevada na exploração receptora do que na população de origem das novilhas de substituição, o facto de se comprarem novilhas de substituição irá reduzir a seroprevalência na exploração receptora (Dubey *et al*, 2007).

2.6.16.9.1.10. Clima

Apesar de não existir, actualmente, muita informação acerca das condições ideais de esporulação dos oocistos de *N. caninum*, presume-se que as temperaturas ambientais altas favoreçam a esporulação, aumentando o risco de infecção (Dubey *et al*, 2007).

2.6.16.9.1.11. Índice de vegetação

Um estudo italiano demonstrou que quando o índice de vegetação no Verão é elevado (o que indica a presença de florestas e árvores folhosas), os animais não pastam, diminuindo assim o risco de infecção (Rinaldi *et al*, 2005). Um outro estudo italiano (Otranto *et al*, 2003), pelo contrário, demonstrou que o facto dos animais não pastarem aumenta o risco de infecção.

2.6.16.9.1.12. Densidade populacional humana

Uma vez que o número de cães se encontra positivamente correlacionado com a seroprevalência, a densidade populacional humana parece ter um efeito semelhante (Dubey *et al*, 2007).

2.6.16.9.1.13. Presença de anticorpos contra agentes de infecção

Alguns estudos demonstram associações positivas entre as seropositividades para *N. caninum* e para outros agentes. VanLeeuwen e colegas (2010) demonstraram a existência de associação positiva entre os animais seropositivos ao vírus da leucemia bovina e os animais seropositivos a *N. caninum*; e Bjorkman, Alenius, Emanuelsson e Ugglä (2000) encontraram, em explorações leiteiras na Suécia, associação estatística entre a presença de anticorpos anti-

BVDV e anti-*N. caninum*. Pelo contrário, em Ontario (Peregrine *et al*, 2006), não foi verificada associação entre os anticorpos de *N. caninum* e os anticorpos contra *Leptospira interrogans*.

2.6.16.9.1.14. Raça

Alguns estudos indicam que as seroprevalências estão relacionadas com a raça dos bovinos, sendo que as vacas de aptidão leiteira, como as Holstein-Frísias, apresentam maior seropositividade, assim como as vacas de leite suecas das raças branca e vermelha (Bartels *et al*, 2006).

2.6.16.9.1.15. Alojamento

Ould-Amrouche e colegas (1999), citados por Dubey e colegas (2007), concluíram que as vacas que se encontravam presas apresentavam maior risco de infecção do que as que se encontravam alojadas em sistema livre.

2.6.16.9.2. Factores de risco de aborto

2.6.16.9.2.1. Seropositividade individual

Relativamente aos factores de risco de aborto, sabe-se que existe uma associação entre as vacas seropositivas e o aborto (Waldner *et al*, 1998; Corbellini, Driemeier, Cruz, Gondim & Wald, 2002), verificando-se um aumento do risco de aborto com o aumento dos títulos de anticorpos para *N. caninum* (Kashiwazaki, Giannechini, Lust & Gil, 2004), sendo que cada unidade de aumento do nível de anticorpos leva a um aumento de 1.01 na taxa de abortos (López-Gatius, Santolaria, Yániz, Garbayo & Almería, 2005). Um estudo realizado na Bélgica (De Meerschman *et al*, 2002) demonstrou a existência de associação positiva entre o nível de anticorpos maternos e a presença de lesões histopatológicas do feto, sendo que estas lesões eram mais proeminentes nos fetos de animais de aptidão leiteira, relativamente aos animais de aptidão cárneas, sendo também a extensão de lesões cerebrais maior nos primeiros.

2.6.16.9.2.2. Seroprevalência nas explorações

Vários estudos, como por exemplo o realizado por Hobson e colegas (2005), indicam que elevadas seroprevalências nas explorações estão associadas a um aumento do risco de aborto ao nível da exploração, no entanto, nem todas as explorações com altas seroprevalências apresentam abortos por *N. caninum*, o que indica que outros factores, além da infecção, podem influenciar o risco de aborto (Dubey *et al*, 2007).

2.6.16.9.2.3. Factores relacionados com o risco de infecção

Estes factores foram já descritos anteriormente (ver acima).

2.6.16.9.2.4. Factores associados à reprodução

Os animais infectados e com história prévia de aborto apresentam maior risco de aborto, comparativamente às vacas infectadas que nunca abortaram (Thurmond & Hietala, 1997).

Alguns estudos (Hobson *et al*, 2005) indicam que altas taxas de retenção placentária estão relacionadas com o aumento do risco de aborto por *N. caninum*. Isto pode ser explicado pelo aumento da probabilidade de transmissão horizontal, ou pelo facto de o parasita estar envolvido na retenção placentária (Dubey *et al*, 2007).

Almería e colegas (2009) observaram que o uso de sémen de touros de aptidão cárnea na inseminação de vacas leiteiras reduzia o risco de aborto, principalmente se os touros fossem de raça *Limousine*.

Bartels, Wouda e Schukken (1999) concluíram que o risco de aborto epidémico por *N. caninum* era superior nas explorações em que os locais de parto eram usados para hospitalizar animais doentes.

2.6.16.9.2.5. Participação nas feiras de gado

As explorações que participam em feiras de gado, apresentam um risco menor de aborto por neospora epidémico (Bartels *et al*, 1999). Isto pode ser explicado pelo facto desta participação indicar que essas explorações comprem novilhas de substituição a outras fontes (Dubey *et al*, 2007) e, como referido anteriormente, a cria das suas próprias novilhas de substituição, aumenta o risco de infecção (Barling *et al*, 2001).

2.6.16.10. Diagnóstico

O diagnóstico de neosporose pode basear-se em análises histopatológicas (na presença de lesões indicativas de neosporose, na demonstração do parasita em secções teciduais coradas pela hematoxilina-eosina e nas análises imunohistoquímicas), na demonstração do parasita (na sua forma viável) e na serologia, assim como em outras análises (Dubey & Schares, 2006). Este diagnóstico deve ter em consideração a idade gestacional, o estado de autólise do feto, as lesões inflamatórias e a presença do parasita, assim como a exclusão de outras causas de aborto bovino (Anderson, 2007).

Nos fetos e nados-mortos, observam-se lesões degenerativas ou inflamatórias na generalidade dos tecidos, no entanto, estas são mais comuns no sistema nervoso central, no coração e no fígado. Nos vitelos congenitamente infectados, raramente se encontra o parasita, mesmo nos animais que apresentam sinais clínicos. Além disso, o número de *N. caninum* encontrados em secções de tecidos bovinos é baixo, sendo difícil o reconhecimento de taquizóitos nos cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (Dubey & Schares, 2006). Assim, torna-se mais proveitoso demonstrar a presença do parasita através de análises imunohistoquímicas (estas representam um método efectivo para a identificação de taquizóitos e quistos tecidulares nos tecidos fetais) (Anderson, 2007). Deste modo, todos os tecidos com lesões visíveis devem ser submetidos a estas análises (Boger & Hattel, 2003), especialmente, o cérebro e o coração (Hillman & Gilbert, 2008). As lesões também podem ser observadas na placenta, no entanto, neste órgão é difícil encontrar o parasita (Dubey & Lindsay, 2006). Estas análises apresentam uma alta especificidade, no entanto, nos fetos severamente autolisados, a sua sensibilidade é baixa (Ortega-Mora, Fernández-Garcia & Gómez-Bautista, 2006). Apesar disso, a demonstração da presença de *N. caninum* nas lesões é a melhor evidência da etiologia do aborto (Dubey & Lindsay, 2006).

Até à data, as tentativas para isolamento de *N. caninum* viável em ratos ou culturas celulares, não têm apresentado sucesso, provavelmente, porque a maioria dos estadios do parasita morrem quando o feto sucumbe à infecção (Dubey & Schares, 2006).

Encontram-se desenvolvidas várias técnicas para serologia, como a imunofluorescência indirecta (IFAT), a aglutinação directa, as análises ELISA e *immunoblotting* (IB) e ainda o teste imunocromatográfico rápido (RIT) (Dubey & Schares, 2006). A técnica IFAT tem como desvantagens o facto de requerir alguma experiência por parte do executor, além de que depende sempre da subjectividade de quem lê os resultados (Ortega-Mora *et al*, 2006). Os títulos, obtidos por IFAT, superiores a 1:200 são indicativos de infecção prévia, enquanto os títulos superiores a 1:2000 indicam que o aborto ocorrido recentemente foi causado por *N.*

caninum (Parkinson, 2009b). As técnicas ELISA apresentam a vantagem, relativamente à IFAT, da reacção poder ser objectivamente registada (Ortega-Mora *et al*, 2006). Actualmente, existem variadas técnicas ELISA para diagnóstico de neospora, como a ELISA indirecta e de inibição competitiva. A ELISA indirecta permite usar como amostras o soro e o leite, sendo que as análises ao tanque do leite apresentam a vantagem de permitir obter uma ideia generalizada da situação da neosporose na exploração, a baixo custo. Nalguns casos, pode ser útil o uso de IB para confirmação de infecção (Bartels *et al*, 2006).

A idade e o objectivo da serologia, são factores que devem ser tidos em conta na escolha do valor de *cut-off* (Álvarez-García, Collantes-Fernández, Costas, Rebordosa & Ortega-Mora, 2003). Assim, para testar individualmente os animais antes da sua compra ou antes da sua entrada numa exploração livre de neosporose, deve utilizar-se um valor de *cut-off* que permita obter uma sensibilidade máxima. Pelo contrário, para avaliar a hipótese de refugo de um animal, deve ser usado um valor que permita obter o máximo de especificidade (Ortega-Mora *et al*, 2006).

Actualmente, encontram-se disponíveis novas técnicas de diagnóstico, como o PCR e a determinação da resposta específica do IFN γ . O PCR pode ser usado para a pesquisa do DNA do protozoário no sangue e sémen (Serrano-Martínez *et al*, 2007), podendo este ser quantificado por PCR em tempo real (RT-PCR), tanto no sangue [Okeoma, Stowell, Williamson & Pomroy (2005), citado por Ortega-Mora *et al* (2006)], como no sémen (Serrano-Martínez *et al*, 2007). O PCR também pode ser usado em tecidos fetais (Reitt *et al*, 2007), principalmente quando os fetos se encontram severamente autolisados, não sendo possível a visualização de lesões (Nogareda *et al*, 2009), e no colostro (Moskwa, Pastusiak, Bien & Cabaj, 2007). O estudo das citocinas pró-inflamatórias, como o IFN γ (Nogareda *et al*, 2009), permite fazer uma determinação indirecta da resposta imunitária celular (Ortega-Mora *et al*, 2006), importante na imunidade do tipo Th1, que se encontra relacionada com a imunidade dos bovinos relativamente a parasitas intracelulares, como *N. caninum*. Esta resposta representa um papel importante na redução da multiplicação do parasita (Nogareda *et al*, 2009).

2.6.16.11. Controlo

Nas explorações onde não existe neosporose, o objectivo primordial do controlo é prevenir a introdução do parasita, através de medidas de biossegurança. Pelo contrário, nas explorações infectadas, o objectivo primordial é o decréscimo da transmissão vertical, através da redução

do número de animais seropositivos, sendo também importante a redução da transmissão horizontal, principalmente pelo controlo dos hospedeiros definitivos (Dubey *et al*, 2007). Assim, as principais estratégias de controlo assentam no refúgio dos animais seropositivos, na limitação das circunstâncias que permitem a transmissão horizontal e na vacinação. Isoladamente, nenhuma destas estratégias se apresenta eficaz, no entanto, em conjunto, e dependendo das condições de cada exploração, podem levar à diminuição da incidência de abortos (Parkinson, 2009b).

Para controlo da neosporose deve proceder-se à compra de animais provenientes de explorações sem neosporose ou de explorações com bom desempenho reprodutivo. Torna-se também importante testar todos os animais antes da sua entrada na exploração. De modo a prevenir a transmissão horizontal, deve evitar-se a contaminação das pastagens ou de alimentos com oocistos provenientes dos cães ou de outros potenciais hospedeiros definitivos. O controlo dos cães nas explorações permite também reduzir a transmissão da infecção para o ambiente. Nas explorações leiteiras, a presença destes animais deve ser evitada, devendo ser usadas vedações que não permitam a sua entrada. Caso não seja possível eliminar os cães das explorações, deve ser impedido o acesso destes às zonas de armazenamento de alimentos e às zonas em que se encontram os bovinos. É recomendada também a higiene das pastagens, relativamente às fezes dos hospedeiros definitivos. Nas explorações extensivas sabe-se que a presença de cães pode ser benéfica, pois inibe a presença de outros canídeos silvestres que são potenciais hospedeiros definitivos (Dubey *et al*, 2007). Uma vez que os cães jovens excretam mais oocistos (Godim *et al*, 2005), a presença de cadelas gestantes ou com ninhadas deve ser evitada, principalmente nas áreas acima referidas. Os hospedeiros definitivos também não devem ter acesso aos tecidos infectados dos hospedeiros intermediários (o risco de infecção pode ser diminuído se os fetos abortados, as membranas fetais e os outros tecidos potencialmente infectados permanecerem fora do alcance dos cães). Uma vez que ainda não se tem conhecimento total acerca de quais os hospedeiros intermediários e definitivos de *N. caninum*, é importante prevenir o contacto de tecidos infectados dos potenciais hospedeiros intermediários com os possíveis hospedeiros definitivos, ou seja, deve ser prevenida a ingestão dos tecidos potencialmente infectados pelos cães ou carnívoros selvagens. Devem também ser tomadas medidas para prevenir a contaminação da água de bebida dos bovinos pelas fezes dos cães. Recomenda-se ainda o controlo regular de roedores, pois, actualmente, ainda não se sabe se estes animais podem ou não funcionar como reservatório do parasita. É também relevante evitar os potenciais factores de recrudescência da neosporose, como por exemplo, o stress e a alimentação de baixa qualidade (e. g. micotoxinas) (Dubey *et al*, 2007).

Baillargeon e colegas (2001) defendem que a transferência de embriões [seguindo o procedimento proposto pela IETS (*International Embryo Transfer Society*)], usando como animais receptores vacas seronegativas, é um método eficaz de controlo da transmissão vertical da neosporose, quando as dadoras são seropositivas. O inverso, ou seja, o uso de dadoras seronegativas e receptoras seropositivas, não previne esta transmissão (Baillargeon *et al*, 2001). Esta técnica é bastante vantajosa, principalmente quando se pretende obter descendência de vacas seropositivas com boa genética (Dubey *et al*, 2007). Para diminuir a prevalência de neosporose, pode também, quando possível, ser usado o sémen de machos de aptidão cárnea para inseminar vacas leiteiras (Dubey *et al*, 2007), principalmente o sémen de animais de raça *Limousine* (Nogareda *et al*, 2009).

Uma vez que as vacas infectadas representam um reservatório do parasita, permitindo a infecção lenta de outros animais (por via transplacentária) ou rápida (por transmissão horizontal), pode ser benéfico refugar os animais seropositivos, no entanto, devido a restrições do foro económico, isto nem sempre é possível. Podem assim seguir-se três tipos de estratégias: refugar as vacas seropositivas ou as vacas seropositivas que abortaram, inseminar a descendência de vacas seropositivas unicamente com sémen de machos de aptidão cárnea ou eliminar da reprodução a descendência das vacas seropositivas. Todas estas medidas devem ser precedidas de uma análise custo-benefício, pois só devem ser tomadas quando os ganhos da eliminação da neosporose cobrem os seus custos (Dubey *et al*, 2007).

Se viável, devem realizar-se, anualmente, serologias aos animais. O título de anticorpos pode ser utilizado como uma ferramenta predictiva para identificar os animais infectados com alto risco de aborto. Caso a seroprevalência seja superior a 20% dos animais, a serologia deve ser realizada em todos os animais das explorações, excepto nos animais com menos de 6 meses de vida. Se a prevalência for inferior, fazem-se análises anuais apenas aos animais jovens, com mais de 6 meses, que não foram analisados anteriormente (Nogareda *et al*, 2009).

Outro modo passível de controlo é a vacinação. A vacina ideal deveria proteger os animais das perdas de gestação e da infecção transplacentária, permitindo ainda a distinção, nas serologias, entre os anticorpos vacinais e os anticorpos produzidos por infecção natural. Através do estudo da patogénese da neosporose, percebeu-se que talvez fosse possível desenvolver uma vacina eficaz. Nalguns países foram já testadas algumas vacinas, como a *Bovilis-NeoGuard*, *Intervet*[®], uma vacina morta, no entanto, em Portugal ainda não se encontram vacinas disponíveis comercialmente (Dubey *et al*, 2007).

2.6.16.12. Tratamento

Actualmente, não existe tratamento que se tenha provado ser eficaz e seguro (Dubey *et al*, 2007). Alguns estudos (Kritzner *et al*, 2002) indicam que os vitelos tratados com ponazuril não apresentam o parasita no cérebro, nem noutros órgãos. Os autores observaram também que 50% dos vitelos não tratados eram PCR-positivos no cérebro e músculos. Além disso, nos animais tratados, o título de anticorpos anti-neospora, após a infecção, é inferior ao dos vitelos não tratados. Este estudo demonstra que o fármaco apresenta alguma eficácia, no entanto, são necessários mais estudos, incluindo estudos no campo, com vitelos naturalmente infectados.

3. Estudo de Caso

3.1. Objectivos

O presente estudo de caso incide sobre o parasita *N. caninum* como causa de aborto em bovinos leiteiros. Este caso clínico surgiu numa exploração acompanhada clínica, cirúrgica e reprodutivamente, pelo Dr. Dário Guerreiro. Nesta exploração verificava-se uma alta incidência de abortos e uma diminuição da performance reprodutiva.

Seguem-se os objectivos estabelecidos para o presente trabalho:

- Realizar o diagnóstico diferencial de aborto bovino para a exploração em questão.
- Estimar a prevalência de *N. caninum* na exploração leiteira.
- Perceber qual a influência do protozoário na eficiência reprodutiva da exploração, através da análise do intervalo entre partos.
- Perceber se as medidas de controlo realizadas a partir de 2008 foram eficazes, ou seja, se diminuíram a prevalência de neospora.
- Verificar se podem ser tomadas novas medidas.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Caracterização da exploração

A exploração em questão situa-se na Moita do Ribatejo, apresenta cerca de 40 vacas em ordenha. No dia 30 de Novembro de 2009, o efectivo era constituído por 63 fêmeas adultas, 1 macho adulto, 1 novilho e 15 novilhas nulíparas.

Os animais encontram-se separados em diferentes parques, consoante o estado produtivo e reprodutivo, existindo um vitleiro, um parque para vacas em lactação, um parque de vacas secas no pré-parto e um de novilhas.

No ano de 2007 era utilizada Inseminação Artificial (IA), no entanto, devido aos baixos resultados reprodutivos, actualmente recorre-se à monta natural, estando o macho adulto permanentemente com as vacas adultas e o novilho com as novilhas. Os dados reprodutivos são registados manualmente no “Mapa de exploração”, criado pelo veterinário assistente (não existem quaisquer registos informáticos). O facto de não se recorrer à IA dificulta a análise dos dados, não permitindo o estudo da maioria dos índices reprodutivos. Neste mapa são apontados os diagnósticos e as confirmações de gestação, assim como os exames reprodutivos realizados no pós-parto, sendo referidos os tratamentos e protocolos reprodutivos utilizados, assim como algumas patologias reprodutivas para posterior *follow-up*.

Profilactivamente, todo o efectivo é vacinado, semestralmente, com a *Triangle 9*[®]. Esta é uma vacina inactivada contra IBR (Rinotraqueíte Infecciosa Bovina), BVD (Diarreia Bovina Viral) tipos 1 e 2, Parainfluenza tipo 3, BRSV (Vírus Sincicial Respiratório Bovino) e Leptospirose (*L. pomona*, *L. hardjo*, *L. grippotyphosa*, *L. canicola* e *L. icterohaemorrhagiae*). Anualmente, os animais são vacinados com *Covexin10*[®] ou *Bravoxin10*[®] (vacinas contra a clostridiose), consoante a disponibilidade de mercado.

A exploração apresentava, em 2008, algumas falhas higio-sanitárias, que poderão ter favorecido a infecção por *N. caninum*:

- deficientes condições de higiene no parque de espera da ordenha (sendo estas agravadas na época das chuvas);
- presença de cães com livre acesso a todos os locais da vacaria;
- manjedouras e bebedouros em mau estado de conservação, permitindo o contacto do alimento e da água com possíveis contaminantes, como as fezes dos cães;
- silos em mau estado de conservação, com falhas na drenagem, permitindo também o acesso dos cães e de outros animais à alimentação dos bovinos;
- inexistência de locais específicos e de acesso reservado para o alojamento de vitelos;
- inexistência de um local específico para o parto, com acesso reservado, principalmente a potenciais hospedeiros definitivos.

3.2.2. Animais

Os dados utilizados no presente estudo de caso referem-se aos anos decorrentes entre 2007 e 2010, inclusive. Os diagnósticos de gestação, exames reprodutivos pós-parto, abortos, protocolos de sincronização e tratamentos encontram-se registados no “Mapa de Exploração”. Estes dados correspondem, no total, a 117 animais. Pelos registos, não foi possível inferir sobre a quantidade de animais que foram refugados por problemas reprodutivos, no entanto, morreram/foram refugadas 58 vacas.

Relativamente ao intervalo entre partos, foi apenas possível obter informação acerca de 40 vacas, pois algumas morreram sem nunca ter parido durante o período em estudo, outras nunca pariram e outras pariram apenas uma vez. Assim, apenas foi possível analisar este parâmetro em 30 animais seropositivos, 12 seronegativos, 9 dos que sofreram aborto e em 31 dos animais que não abortaram.

Durante este período foram realizadas duas serologias, em 2008 e 2010. Em 2008 foram pesquisados, em 71 animais, anticorpos anti-VBVD, anti-BHV-1, anti-*Chlamydophila* sp. e anti-*N. caninum*. No ano de 2010, foram apenas pesquisados anticorpos para a clamidiose e neosporose. Esta serologia foi realizada em 41 animais. As amostras de sangue para análise foram recolhidas a partir da veia coccígea dos animais. Em ambas as análises, o teste serológico utilizado foi o ELISA. A serologia realizada em 2008 foi efectuada no *Labopat*[®], um laboratório situado em Espanha, e a serologia realizada em 2010 num laboratório português, o *Arbusset, Lda*[®]. Em 2008, e devido ao crescente problema de perdas de gestação, foram analisados, no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), dois fetos abortados, recolhidos em dias distintos e provenientes de diferentes vacas, com tempo de gestação entre os 4 e 5 meses. Nestas análises foram pesquisados por PCR, o BVDV, o BHV-1 e *N. caninum*. Foi também realizado o isolamento bacteriológico de *Leptospira* sp. e *Campylobacter* sp. O género *Chlamydophila* sp. foi pesquisado por PCR e por inoculação em embriões de pintos.

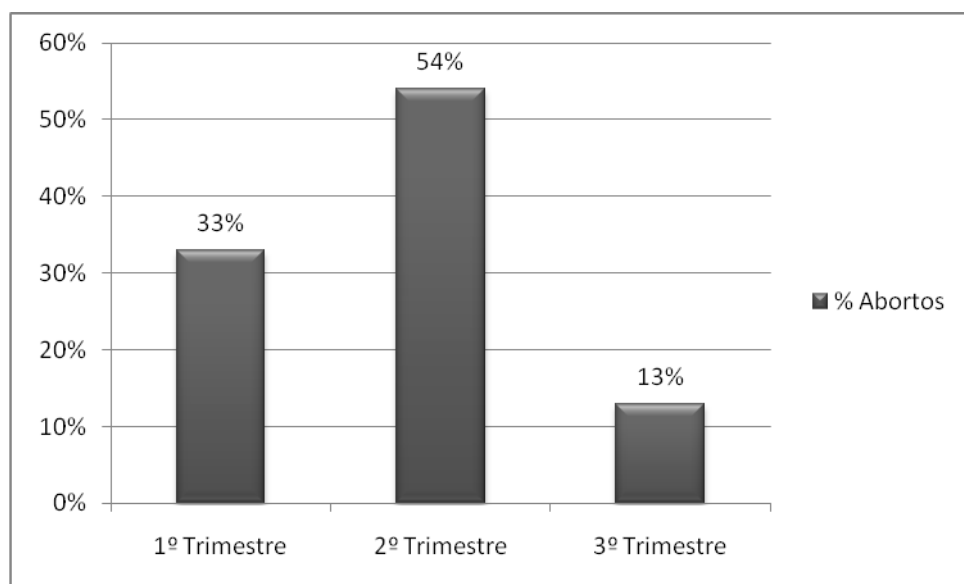
3.2.3. Tratamento de dados

A análise dos dados foi efectuada através dos *softwares* SPSS[®] versão 18.0, e *Microsoft Excel* 2007[®], tendo sido calculadas as prevalências e realizadas as análises de prevalências e testes estatísticos, nomeadamente correlações, o *Odds ratio* e o Teste T para amostras independentes.

3.3. Resultados

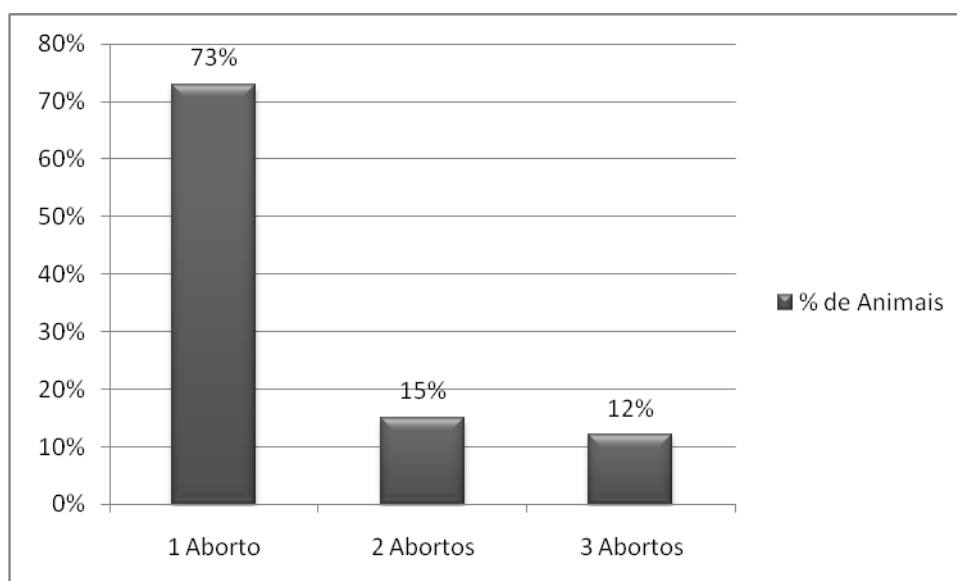
Desde o ano de 2007 até ao dia 15 de Abril de 2010, foram analisados os registos e resultados de análises de 117 animais. Durante este período 33 animais abortaram, ou seja, 28% (n=117) e a incidência de abortos foi de 39% (n=117), pois ocorreram 46 abortos. Como se pode observar no gráfico 4, a proporção dos abortos ocorridos no primeiro, segundo e terceiro trimestres de gestação foi de 33%, 54% e 13%, respectivamente.

Gráfico 4 – Representação dos trimestres de gestação em que ocorreram os abortos (n=46).



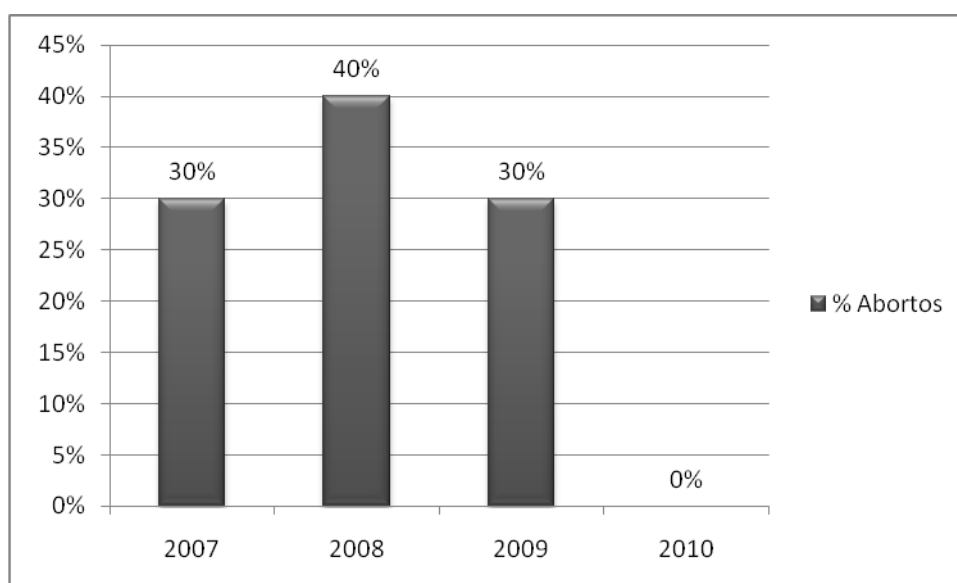
Foi também possível observar que 73% dos animais sofreram apenas um aborto, 15% sofreram dois abortos e 12% sofreram três abortos, num total de 33 vacas abortadas. Destas, 9 sofreram mais do que um aborto, tendo ocorrido um total de 22 abortos repetidos (gráfico 5).

Gráfico 5 – Representação da proporção de vacas que sofreram abortos repetidos (n=33).



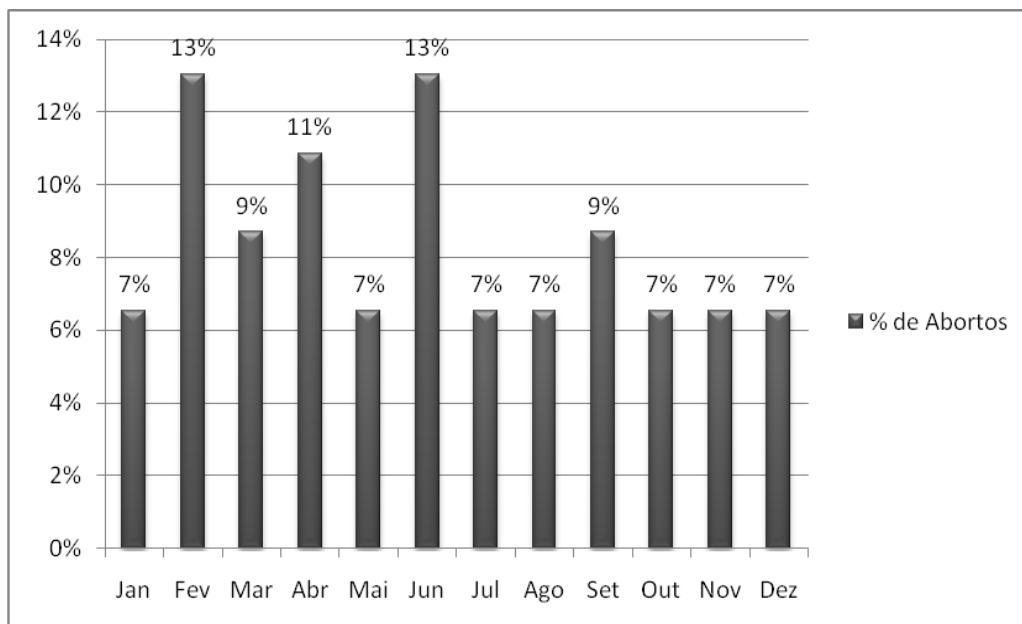
Ao observar a distribuição dos abortos ocorridos no decorrer do período em estudo (gráfico 6), pode verificar-se que estes se encontram mais concentrados no ano de 2008, pois 40% dos abortos ocorreram nesse ano. Em 2007 e 2009, ocorreram 60% dos abortos, 30% em cada um dos anos. Em 2010, até ao dia 15 de Abril, não se verificaram quaisquer abortos.

Gráfico 6 – Representação da distribuição da incidência abortos durante o período em estudo (n=46).



A incidência dos abortos encontra-se uniformemente distribuída durante o ano (gráfico 7), verificando-se apenas um pequeno aumento desta incidência nos meses de Fevereiro (13%), Abril (11%) e Junho (13%).

Gráfico 7 - Representação da distribuição da incidência abortos durante o ano (n=46).

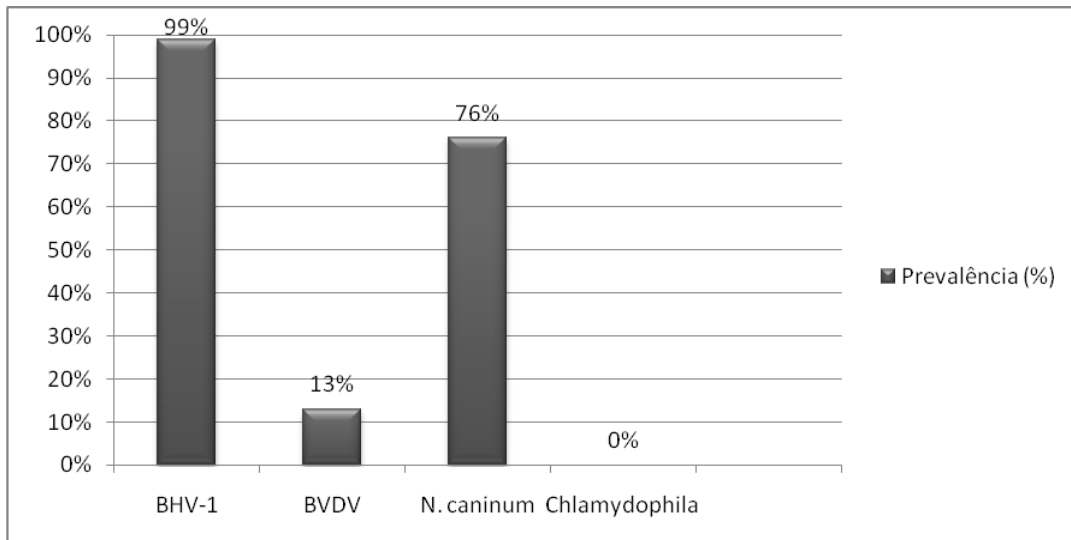


Serologias:

Relativamente à serologia realizada em 2008, 99% dos animais apresentaram-se positivos a BHV-1, 13% positivos a BVDV e 76% positivos a *N. caninum*. Nenhum dos animais apresentava anticorpos anti-*Chlamydophila* sp. (gráfico 8). Os dois touros presentes na exploração encontravam-se entre os animais seropositivos a *N. caninum*.

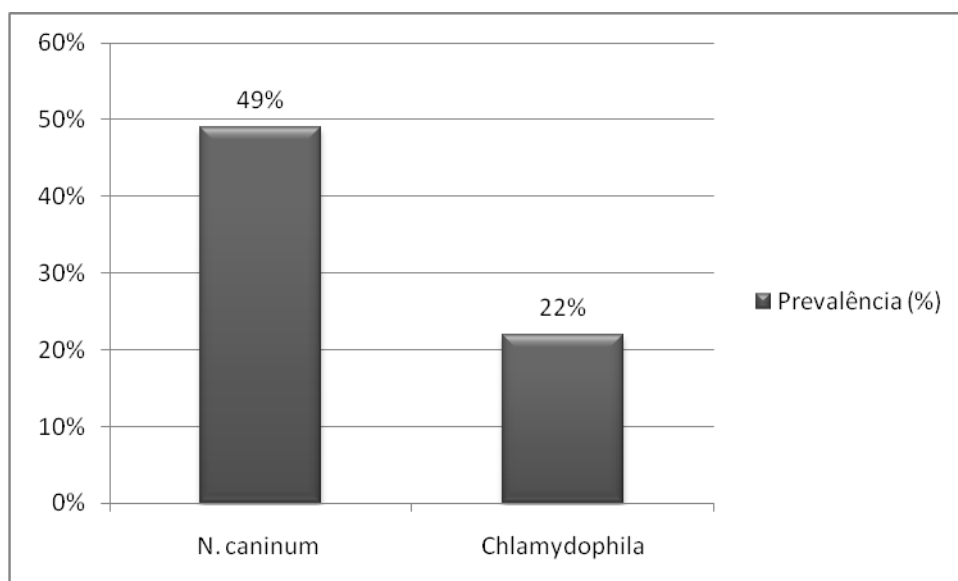
Até à data da serologia, 21 vacas tinham abortado, sendo que destas, 18 apresentavam anticorpos anti-*N. caninum*, ou seja, 86% (n=21). Até à data da serologia, 30% das vacas abortaram (n=69, representando o *n* o número de animais aos quais foi efectuada serologia, com excepção dos dois machos presentes na exploração). O número de abortos ocorridos correspondeu a 25, ou seja, a incidência de abortos nos animais analisados correspondeu a 36% (n=69).

Gráfico 8 - Representação da serologia realizada em 2008 (n=71).



Na serologia realizada em 2010, 49% dos animais eram positivos a *N. caninum* e 22% a *Chlamydia* sp. (gráfico 9). Dos 41 animais aos quais foi realizada a serologia, 15 sofreram abortos e destes, 6, ou seja, 40%, eram seropositivos a neosporose (n=15). A percentagem de animais aos quais foi realizada a serologia e que sofreram abortos correspondeu a 37% (n=41). A incidência de abortos foi de 41% (n=41).

Gráfico 9 – Representação da serologia realizada em 2010 (n=41).



Na tabela seguinte (tabela 4), podem observar-se as médias e desvios padrão do intervalo entre partos da exploração (geral), dos animais seropositivos, seronegativos, dos que sofreram aborto e dos que nunca abortaram. Os animais seropositivos apresentam um prolongamento do intervalo entre partos correspondente a 77 dias comparativamente aos seronegativos, e os animais que abortaram apresentam um prolongamento de 40 dias relativamente aos animais que nunca sofreram aborto.

Tabela 4 – Médias e Desvios Padrão dos diferentes intervalos entre partos.

Intervalo Entre Partos	N	Média (em dias)	Desvio Padrão (em dias)
Geral da Exploração	40	480,76	168,93
Dos animais seropositivos	30	504,40	187,83
Dos animais seronegativos	12	427,17	64,54
Dos animais que abortaram	9	509,11	245,39
Dos animais que não abortaram	31	469,03	145,15

N: Número de animais analisados.

De acordo com a correlação de Spearman, não se verificam associações estatísticas entre os vários dados, ou seja, entre o trimestre de gestação em que ocorreu o aborto e os resultados serológicos, entre o trimestre e o intervalo entre partos, e entre o intervalo entre partos e os resultados serológicos ($p > 0,05$). Através do *Odds ratio* foi possível verificar que o aborto e a serologia são estatisticamente independentes, pois o intervalo de confiança de 95% inclui a unidade, ou seja, o 1. O teste T para amostras independentes não identificou diferenças estatisticamente significativas entre a média do intervalo entre partos dos animais positivos a *N. caninum* e o intervalo entre partos dos animais seronegativos, assim como entre o intervalo entre partos dos animais que abortaram e dos que não abortaram ($p > 0,05$).

Fetos abortados:

O grau de autólise dos fetos abortados era variável. Exteriormente, não se observaram quaisquer lesões características, no entanto, não foram realizadas necrópsias a nenhum dos fetos. Na tabela seguinte (tabela 5) podem ser observados os resultados das análises realizadas aos dois fetos. Ambos apresentavam positividade a *N. caninum*. Não foram encontrados BVDV, BHV-1, *Leptospira* sp. nem *Campylobacter* sp. No Feto 1 foi demonstrada a presença de *C. abortus*, por PCR e por inoculação em embriões de pintos.

Tabela 5 – Resultados das análises realizadas aos dois fetos em estudo (n=2).

Agente Pesquisado	Análise Laboratorial	Feto 1	Feto 2
BVDV	PCR	Neg.	Neg.
BHV-1	PCR	Neg.	Neg.
<i>N. caninum</i>	PCR	Pos.	Pos.
<i>Leptospira</i> sp.	Isolamento bacteriológico	Neg.	Neg.
<i>Campylobacter</i> sp.	Isolamento bacteriológico	Neg.	Neg.
<i>Chlamydophila</i> sp.	Inoculação em embriões de pintos	Pos.	Neg.
	PCR	<i>C. abortus</i>	Nd

BVDV: Vírus da Diarreia Bovina Viral; BHV-1: Herpesvírus Bovino serótipo 1;

PCR: *Polymerase Chain Reaction*; Neg.: Negativo; Pos.: Positivo. Nd: não disponível.

3.4. Discussão

Nesta exploração, como já foi referido, os animais apresentavam baixa performance reprodutiva e uma alta incidência de abortos. Uma vez que a maioria dos diagnósticos de gestação foram realizados entre os 35 a 45 dias de gestação, não foi possível retirar quaisquer conclusões acerca das perdas embrionárias, pois estas dificilmente eram identificadas.

A taxa de diagnóstico de abortos é geralmente baixa, representado cerca de 35% de todos os casos em que são submetidos para análise o feto e a placenta. Isto acontece, provavelmente, pelo facto de na espécie bovina ocorrer, frequentemente, um atraso entre a morte fetal e a sua expulsão, pelo que os fetos surgem com um elevado grau de autólise, o que diminui a sensibilidade dos testes de diagnóstico (Cabell, 2007). Como referido anteriormente, a maioria dos abortos são infecciosos, sendo essa a razão pela qual serão apenas abordados, no caso clínico, os agentes responsáveis por este tipo de aborto.

Diagnóstico diferencial:

Devido a condicionantes económicos, não foi possível pesquisar todos os agentes passíveis de causar aborto bovino. Assim, foram apenas consideradas as causas infecciosas mais comuns, nomeadamente: leptospirose, IBR, BVD, campilobacteriose, clamidiose e neosporose. A brucelose não foi pesquisada devido ao estatuto sanitário da exploração (oficialmente indemne). Apesar de existir a possibilidade desta serologia não identificar todos os animais infectados, uma vez que 15% dos animais não fazem seroconversão após o parto ou aborto (Yaeger & Holler, 2007), é pouco provável que tenha sido este o agente causador dos abortos, pois o saneamento é realizado todos os anos, portanto, os animais, durante o período em estudo, foram saneados 3 vezes. Relativamente ao *H. somni*, os surtos de abortos causados por este agente são raros e, na sua maioria, esporádicos (Yaeger & Holler, 2007). Os abortos causados por listeriose, normalmente, são também esporádicos, ocorrendo, maioritariamente, no terceiro trimestre de gestação. As vacas afectadas podem apresentar febre, perda de peso, endometrite e retenção placentária (Givens & Marley, 2008). Torna-se pouco provável que tenha sido esta a causa dos abortos uma vez que a maioria destes ocorreram durante segundo trimestre de gestação (54%), e apenas 13% dos animais abortaram no terceiro trimestre. Além disso, os animais em estudo não apresentaram quaisquer sinais clínicos desta doença. Apesar dos abortos por salmonelose poderem surgir sem que os animais apresentem sinais de doença (Radostits *et al*, 2007a), muitas vezes os animais apresentam febre elevada, assim como diarreia e disenteria severas (Parkinson, 2009b), anorexia, hipogaláctia e, por vezes, retenção placentária (Radostits *et al*, 2007a). Além disso, na maioria das vezes, apenas um ou dois dos animais da exploração sofrem aborto (Parkinson, 2009b). Assim, a inclusão da salmonelose no diagnóstico diferencial do estudo de caso não é relevante. Geralmente, nos surtos de abortos, não são realizados testes de rotina para pesquisa de *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, pois apesar de serem responsáveis por perdas de gestação, a sua importância nos abortos infecciosos bovinos é reduzida (Cabell, 2007). Embora muitos dos abortos bovinos ocorridos se encontrem associados a infecções por bactérias oportunistas, os abortos causados por estes agentes são esporádicos (Anderson, 2007) e estes, apesar de infecciosos, não são classificados como causas contagiosas de aborto (Yaeger & Holler, 2007). A Língua Azul também não é uma doença contagiosa (Radostits *et al*, 2007c) e, além disso, nas zonas endémicas, a infecção bovina é, normalmente, inaparente (Barrat-Boyes & MacLachlan, 1995). A tricomonose encontra-se mais frequentemente associada a morte embrionária do que a aborto (Anderson, 2007) e os animais afectados apresentam, frequentemente, corrimento vulvar intermitente (Parkinson, 2009b), o que não foi observado nas vacas analisadas, pelo que não é incluída no

presente diagnóstico diferencial. O aborto pode também ser causado por sarcocistose aguda, porém, os animais afectados apresentam alguns sinais clínicos, como febre, anorexia e anemia (Dubey & Lindsay, 2006), o que não foi verificado nestes animais. A presença de fungos não foi pesquisada porque estes se encontram associados a abortos esporádicos (Givens & Marley, 2008) e as lesões fetais e placentárias são bastante características (Cabell, 2007), não tendo sido observadas nos fetos abortados.

A escolha das análises a efectuar, tanto às vacas como aos fetos abortados, deve ter em conta, principalmente, os dados epidemiológicos da região em que se situa a exploração, a história clínica geral da exploração e das vacas individualmente, assim como as lesões exteriores dos fetos. Uma vez que na região onde se situa esta exploração existe alguma prevalência de leptospirose, torna-se importante pesquisar esta espiroqueta nos fetos abortados, apesar dos animais serem vacinados para esta doença. A campilobacteriose, embora seja responsável, maioritariamente, por mortes embrionárias, por vezes também pode causar aborto. Além disso, esta doença é mais comum quando é praticada a monta natural (Yaeger & Holler, 2007), facto que se verifica nesta exploração. Relativamente aos vírus, apesar de os animais serem vacinados, é importante a pesquisa de BVDV e o BHV-1, dado que são causas bastante comuns de aborto bovino, causando elevadas perdas económicas.

Diagnóstico mais provável:

Na serologia de 2008, 99% dos animais apresentavam seropositividade a BHV-1. Esta percentagem pode ser explicada pelo facto de todos os animais serem vacinados com *Triangle 9*[®], dado que esta vacina não tem marcação para este vírus. Como para o BVDV foram pesquisados anticorpos específicos para a proteína p80/p125, o resultado (13%) exprime infecção natural, porém, esta percentagem é reduzida, sendo pouco provável que este vírus tenha sido responsável pelos abortos.

Um dos fetos analisados revelou positividade a *C. abortus*. Como nenhum dos animais demonstrou, na serologia de 2008, positividade para este agente, provavelmente, a sua presença no feto é devida a contaminação, pois os fetos foram recolhidos do solo. Esta bactéria, normalmente, causa abortos a partir do sétimo mês de gestação (Parkinson, 2009b) e estes são esporádicos (Livingstone & Longbottom, 2006), ocorrendo, com frequência, retenção placentária (Parkinson, 2009b), o que permite inferir, além dos resultados serológicos, que a *C. abortus* não tenha sido um agente importante neste surto.

Após a ocorrência de aborto bovino, nados-mortos ou de mortalidade neonatal, a serologia das vacas afectadas permite perceber se os animais se encontravam ou não infectados por *N.*

caninum, e também se experimentaram infecção recente ou se esta é crónica (Dubey & Schares, 2006). A maioria das vacas que originam fetos infectados são seropositivas na altura do aborto (De Meerschman *et al*, 2002), assim como depois do parto (Davison *et al*, 1999a). No entanto, a vaca pode apresentar serologia positiva a neosporose, mas o aborto, nado-morto ou o nascimento de um vitelo fraco, podem ter outra causa (Dubey & Schares, 2006). No geral, os títulos de anticorpos são mais elevados nos animais que abortaram devido à neosporose, relativamente aos animais com gestações normais, porém os títulos individuais não permitem determinar a etiologia do aborto (Dubey & Lindsay, 2006). Uma amostra única de soro de um animal individual pode não reflectir com exactidão o estado de infecção da vaca, pois os títulos de anticorpos podem flutuar, podendo descer abaixo do valor de *cut-off*. Por vezes, vacas que apresentam falha reprodutiva por neosporose, apresentam títulos de anticorpos específicos pouco significativos. Títulos de anticorpos altos na altura do aborto podem também descer gradualmente durante os vários meses posteriores a esta ocorrência (Anderson, 2007). Apesar do parasita *N. caninum* apresentar relações estreitas com o *T. gondii* e as espécies de *Sarcocystis* e de outros apicomplexas, a reactividade cruzada não é importante (Dubey & Lindsay, 2006).

Pode ser obtido um diagnóstico com carácter mais definitivo quando o problema reprodutivo é examinado ao nível da exploração ou dos animais em risco. É necessário determinar, por métodos estatísticos, se a proporção de seropositividade é maior nas vacas que abortaram, relativamente às que não abortaram. Pode também ser necessário identificar a via de transmissão predominante, usando por exemplo um ELISA de afinidade funcional, pois permite, como referido anteriormente, perceber se a infecção é recente ou crónica (Dubey & Schares, 2006). Para perceber se o aborto é endémico ou epidémico, pode estimar-se também o *odds ratio* (Dubey *et al*, 2007). A análise das relações familiares permite também compreender qual a via de transmissão predominante (Dubey & Schares, 2006). Se as vacas e as suas filhas forem seropositivas, assim como os seus vitelos, e existir uma distribuição uniforme de seropositividade entre os diferentes grupos etários, a via de transmissão predominante é a vertical (Dubey *et al*, 2007).

Os testes serológicos também podem ser usados para estudar a infecção nos fetos abortados, pois o sangue fetal, os fluidos pleurais e peritoneais e o conteúdo abomasal, podem conter anticorpos específicos para *N. caninum* (Dubey & Schares, 2006), no entanto, o fluido peritoneal é o mais indicado para serologia (Dubey & Lindsay, 2006). Alguns estudos, como o realizado por Álvarez-García e colegas (2003), demonstram uma sensibilidade baixa quando são usadas as análises ELISA e IFAT na serologia fetal (Dubey & Schares, 2006).

Recentemente, foi demonstrado que o uso da técnica *Western-Blot* aumentava a especificidade e sensibilidade desta serologia (Álvarez-García, Pereira-Bueno, Gómez-Bautista & Ortega-Mora, 2002). Os títulos de anticorpos fetais não permitem fazer o diagnóstico definitivo, pois mesmo que a serologia seja positiva, não permite concluir, com certeza, que o parasita *N. caninum* foi o agente responsável pela doença (Dubey & Schares, 2006), pois a maioria dos fetos infectados por este parasita desenvolvem-se normalmente, originando vitelos saudáveis (Moore *et al*, 2001). O mesmo acontece para as serologias negativas, ou seja, não são indicativas de que não ocorreu infecção (Dubey & Lindsay, 2006; Parkinson, 2009b), pois a síntese de anticorpos fetais depende do estágio de gestação (Dubey & Lindsay, 2006) [numa fase precoce da gestação, quando o feto ainda não apresenta um sistema imunitário competente, a serologia é negativa (Parkinson, 2009b)], do nível de exposição ao agente e do tempo decorrido entre a infecção e o aborto (Dubey & Lindsay, 2006).

A serologia também pode ser realizada (anteriormente à ingestão de colostro) em vitelos com sinais clínicos ou com suspeita de infecção congénita (Hillman & Gilbert, 2008). Se esta serologia for negativa, torna-se pouco provável que os vitelos estejam infectados por *N. caninum* (Dubey & Schares, 2006).

Outra técnica utilizada é a detecção, por PCR, da presença de DNA do parasita em fetos abortados. A presença do DNA não é conclusiva de que o aborto foi causado por *N. caninum*, devendo ser tidos em conta os dados epidemiológicos das explorações (Nogareda *et al*, 2009). Assim, para estabelecer um diagnóstico definitivo, ou seja, para estabelecer uma relação de causa-efeito, é importante fazer uma abordagem integrada da serologia, análises imunohistoquímicas e outras, que permitam demonstrar a infecção pelo parasita, tanto na vaca como nos fetos abortados. Se o sangue maternal, os fluidos ou tecidos fetais forem positivos por serologia ou PCR, o aborto pode encontrar-se associado ao parasita, porém, é importante excluir outras causas de aborto bovino. Se as lesões cerebrais e cardíacas forem severas e se tiver demonstrado a presença de taquizoítos de *N. caninum* nestas lesões, é muito provável que a falha reprodutiva tenha sido causada pelo protozoário em questão. No entanto, é necessário ter em consideração que, mesmo quando as lesões fetais encontradas não são fatais, pode haver envolvimento do parasita. Sabe-se também que se for usado um método de diagnóstico com menor sensibilidade podem ocorrer falsos negativos, como em abortos tardios ou em explorações com neosporose endémica ou mesmo epidémica, pois neste último caso, normalmente, a infecção é recente e a resposta humoral pode ainda não estar completamente desenvolvida. Quando não há possibilidade de realizar análises aos fetos, ou

quando estes não apresentam lesões (ou no caso destas lesões serem ligeiras) e a serologia maternal ou fetal, ou o PCR, forem positivos, é necessário avaliar os animais que se encontram em risco de aborto por *N. caninum*, ou seja, é necessário verificar se a seroprevalência é mais alta nas vacas que abortaram relativamente às que não abortaram. Se houver associação estatística entre a positividade da serologia e o aborto, é racional concluir que o diagnóstico mais provável é neosporose (Dubey & Schares, 2006).

No caso em questão, em 2008, 76% dos animais apresentavam seropositividade para *N. caninum*, tendo também sido demonstrada a presença de DNA do parasita nos dois fetos abortados. Uma vez que as análises realizadas apresentaram resultados negativos para os outros agentes, há uma forte indicação de que os abortos em questão tenham sido causados por este protozoário. Apesar de não existir associação estatística entre a seropositividade e o aborto, 86% dos animais abortados até à data da primeira serologia eram seropositivos a neospora. Provavelmente, se a amostra fosse maior, seria encontrada associação estatística. Assim, neste caso, o diagnóstico mais provável é neosporose. Isto é corroborado pelo facto das vacas não manifestarem quaisquer outros sinais além do aborto, não apresentando também retenção placentária, que é uma sequela importante de uma vasta quantidade de agentes infecciosos causadores de aborto. Além disso, os abortos causados por neospora ocorrem, maioritariamente, no segundo trimestre de gestação, o que coincide com os resultados obtidos nesta exploração, pois 54% dos animais abortaram neste trimestre. Anderson e colegas (1995) e Pabón e colegas (2007), como acima referenciado, demonstraram que uma pequena proporção dos animais afectados por neospora sofrem abortos repetidos, o que é verificado em 27% dos animais em estudo.

A distribuição anual dos abortos é relativamente homogénea, não sendo encontrados aumentos significativos da sua incidência em determinadas épocas do ano, o que coincide com o padrão de abortos da neosporose.

Como os abortos se encontram espaçados no tempo, o padrão presente é endémico (pois 28% dos animais abortaram durante os anos de 2007 a 2010 inclusive, o que coincide com o padrão endémico em que mais de 5% dos animais abortam durante vários). Apesar de não se poder comprovar que a transmissão ocorrida na exploração seja maioritariamente transplacentária, pois não foi possível analisar a descendência das vacas seropositivas, pensa-se que seja esse o padrão de transmissão presente, porque este se encontra relacionado com quadros endémicos e, além do mais, a transmissão transplacentária do parasita ocorre de uma forma bastante eficiente. Embora não tenha sido realizada serologia para pesquisa de anticorpos anti-neospora nos cães existentes da exploração, e de a via de transmissão predominante parecer

ser a vertical, a prevalência do protozoário pode ter sido exacerbada pela presença do hospedeiro definitivo infectado. Abbitt e Radse (2007) consideram que os abortos repetidos podem ser causados por uma re-activação da infecção latente ou pela ocorrência de uma nova infecção pela ingestão de oocistos excretados nas fezes dos hospedeiros definitivos, o que explicaria as 9 vacas que fizeram abortos repetidos. É também necessário ter em conta que podem ocorrer falsos negativos quando há neosporose endémica, o que pode explicar o facto de nem todas as vacas abortadas serem seropositivas.

Impacto na performance reprodutiva:

A avaliação regular do estado de fertilidade da exploração é parte essencial de qualquer programa de controlo. Tradicionalmente, o objectivo de produção é um parto por vaca por ano. No entanto, nas vacas altas produtoras Holstein-Frísias, o ideal é, frequentemente, que as vacas tenham um parto a cada 14 meses, em vez dos tradicionais 12. O intervalo entre partos corresponde ao intervalo, em dias, entre dois partos sucessivos. O índice de partos é a média de intervalos de todas as vacas presentes numa exploração, num ponto de tempo específico, calculado, retrospectivamente, a partir da data de parto mais recente. Este é um bom método para medir a fertilidade dos animais da exploração. A desvantagem deste parâmetro é que é apenas retrospectivo, não permitindo obter informação acerca do estado actual da fertilidade na exploração. Além disso, não tem em consideração a fertilidade das novilhas e tende a sobreestimar a fertilidade, uma vez que, frequentemente, uma grande quantidade de animais com problemas reprodutivos são refugados. Além do intervalo entre partos, podem ser usados outros parâmetros reprodutivos para avaliar a fertilidade, como o intervalo entre o parto e o primeiro serviço, o intervalo entre o parto e a concepção, o número de dias em aberto, a taxa de gestação, o intervalo entre o primeiro serviço e a concepção e a eficiência reprodutiva, entre outros (Parkinson & Barret, 2009). Neste caso clínico, devido ao facto de ser usada a monta natural, não sendo possível o registo da data do serviço nem do número de serviços realizados por vaca, é apenas possível calcular o intervalo entre partos, pelo que não pode ser avaliada a influência da infecção por *N. caninum* noutros índices reprodutivos. No entanto, sabe-se que uma importante perda económica relacionada com os abortos se concentra no facto destes aumentarem consideravelmente o intervalo entre-partos.

Não foi possível, provavelmente devido ao número reduzido de amostras, encontrar diferença estatística significativa entre as médias dos diferentes intervalos entre partos analisados, no entanto, os animais seropositivos apresentavam em média, mais 77 dias de intervalo entre partos relativamente aos seronegativos, o que é explicado pelos abortos causados pela

infecção por *N. caninum*. Os animais que abortaram apresentam mais 40 dias de prolongamento deste intervalo, relativamente aos que não abortaram. O valor deste parâmetro nos animais abortados está subestimado pois, devido provavelmente ao refugo selectivo, apenas foi possível obter os valores de intervalos entre partos de 9 animais que sofreram abortos. O facto deste valor se encontrar subestimado pelo reduzido número de animais é também corroborado pelo facto do desvio padrão ser mais elevado nos animais que abortaram (245 dias), comparativamente com os animais que não sofreram aborto (145 dias). O desvio padrão também é mais elevado nos animais seropositivos (188 dias) do que nos seronegativos (65 dias). No total dos animais o intervalo entre partos corresponde a 481 dias, ou seja, mais 116 dias do que o intervalo entre partos ideal, ou seja, 365 dias. Segundo Parkinson e Barrett (2009), este prolongamento, em termos económicos, corresponde a um custo acrescentado de 348£ por animal (tendo em conta os preços realizados em 1995 no Reino Unido, em que cada dia além dos 365 dias, teria um custo de 3£). Estes valores, apesar de não se referirem à realidade portuguesa, permitem compreender o impacto económico da neosporose nas explorações leiteiras.

Factores de risco:

Ao analisar as condições da exploração podem encontrar-se alguns factores de risco de infecção e de aborto:

- Presença de hospedeiros definitivos:
 - Dijkstra, Barkema, Eysker, Hesselink e Wouda (2002a), no seu estudo, observaram que se os cães defecassem nos locais de armazenamento de alimentos ou nos locais de alimentação, os níveis de infecção pós-natal seriam maiores relativamente às explorações em que isto não ocorria;
 - Este estudo permitiu ainda concluir que a seroprevalência é maior nas explorações em que os cães têm acesso às placentas dos bovinos, corrimentos uterinos e colostro ou leite (Dijkstra *et al*, 2002a; VanLeeuwen *et al*, 2010), o que indica que existe uma relação dose-dependente (VanLeeuwen *et al*, 2010).
- Pasto, forragem e água de bebida:
 - As formas de alimentação e beberagem que permitem a contaminação pelo hospedeiro definitivo, representam um risco de infecção elevado para os hospedeiros intermediários (Dubey *et al*, 2007).

- Fonte de novilhas de substituição:
 - Uma vez que a prevalência nesta exploração é elevada, o facto de não serem compradas novilhas de substituição perpetua a infecção, aumentando a sua prevalência, devido à eficiência da transmissão vertical.
- Densidade populacional humana:
 - Segundo Dubey e colegas (2007), como referido anteriormente, um aumento da densidade humana parece estar positivamente relacionado com a seroprevalência. Uma vez que a Moita é uma zona com uma densidade populacional relativamente elevada, este é considerado um factor de risco presente.
- Presença de anticorpos contra agentes infecciosos:
 - Num estudo italiano (Rinaldi *et al*, 2007), foi demonstrada a existência de uma associação entre a presença anticorpos contra o BHV-1 e os anticorpos contra *N. caninum*. Isto pode acontecer devido a imunossupressão causada pelo vírus, depois da infecção natural ou da vacinação, o que permitiria a infecção secundária pelo protozoário (Dubey *et al*, 2007). Os animais em estudo, devido ao facto de serem vacinados com *Triangle 9*[®], apresentavam, como foi referido, 99% de seropositividade a BHV-1. Na serologia realizada em 2008, observou-se uma seropositividade para VBVD correspondente a 13%. Esta seropositividade, apesar de relativamente baixa, conjuntamente com a observada para o BHV-1, podem ter causado imunossupressão, permitindo a difusão do parasita na exploração.
- Raça:
 - As vacas de aptidão leiteira apresentam maior seropositividade. Estas diferenças de prevalência entre as diferentes raças podem não estar relacionadas com uma susceptibilidade aumentada de determinadas raças, mas sim com diferentes sistemas de produção, pois as vacas Holstein-Frísias, normalmente, integram sistemas de produção mais intensivos, com maior densidade animal, relativamente às raças autóctones, que se encontram, frequentemente, em pastoreio (Dubey *et al*, 2007). Além disso, pode haver uma manutenção de infecção maior em determinadas linhas animais (Bartels *et al*, 2006).
- Seropositividade individual:
 - Existe uma associação positiva entre a seropositividade e o aborto (Waldner *et al*, 1998; Corbellini, Driemeier, Cruz, Gondim & Wald, 2002).

- Seroprevalência nas explorações:

- O risco de aborto é mais elevado nas explorações com seroprevalências altas (Hobson *et al*, 2005).

- Factores associados à reprodução:

- Animais infectados e com história prévia de aborto apresentam maior risco de aborto (Thurmond & Hietala, 1997).
- Hobson e colegas (2005), observaram uma associação positiva entre a ocorrência de abortos por *N. caninum* e a taxa anual de animais que retornavam ao estro depois de ter sido confirmada a gestação. Altas taxas de perdas de gestação precoces aumentam a probabilidade de acesso dos hospedeiros definitivos a material infeccioso, aumentando a frequência da transmissão horizontal. Estes resultados podem indicar que o parasita não é só responsável por abortos, mas também por perdas de gestação precoces (Dubey *et al*, 2007). Nesta exploração, como já foi referido, não há possibilidade de avaliar as perdas de gestação precoces devido ao facto do diagnóstico de gestação ser realizado entre os 35 a 45 dias de gestação.

Como pode ser observado, a exploração em estudo apresenta riscos importantes de infecção e aborto, o que permite corroborar o diagnóstico de neosporose.

Medidas de controlo:

Em 2008, devido ao problema crescente de abortos, foram tomadas, gradualmente, algumas medidas de controlo. As acções adoptadas foram as seguintes:

- Impedimento do acesso dos hospedeiros definitivos às zonas onde se encontram os bovinos, com especial preocupação com a contaminação do alimento e água pelas fezes dos cães;
- Isolamento dos animais gestantes, próximos do parto, de modo a não permitir o acesso dos cães aos produtos resultantes do parto, potencialmente contaminados;
- Eliminação dos produtos do aborto e do parto, de modo a que os hospedeiros definitivos não tenham qualquer acesso a estes.

A serologia realizada em 2010 permitiu perceber qual a eficácia destas medidas. A seroprevalência diminuiu 27% relativamente a 2008, o que demonstra que estas medidas foram eficazes.

Uma vez que, em 2008, a prevalência do protozoário era bastante alta (76%), não era viável o refugo de todos os animais infectados. No entanto, e apesar de não existir informação

específica acerca do refugio de animais por causas reprodutivas, o médico veterinário assistente, o Dr. Dário Guerreiro, refere que muitos dos animais que se encontram dados como mortos foram refugados, muitos devido ao facto de abortarem, o que, provavelmente, terá tido também alguma influência no decréscimo da seroprevalência da exploração. Uma vez que se vão refugando, devido ao aborto, as vacas seropositivas, responsáveis pelo nascimento de vitelas congenitamente infectadas, há uma maior tendência para a manutenção na exploração de linhas familiares seronegativas, pelo que, com o passar do tempo, é esperado que a seroprevalência vá decrescendo.

Relativamente ao controlo, este deve incidir, como descrito anteriormente, na diminuição da transmissão, tanto vertical como horizontal (Dubey *et al*, 2007). As medidas tomadas em 2008 visam, principalmente, a diminuição da transmissão horizontal, no entanto, medidas para diminuir a transmissão vertical deveriam ser tomadas, uma vez que esta parece ser a principal via de transmissão presente. Apresentam-se seguidamente algumas medidas que poderiam também ser efectuadas:

- Compra de novilhas de substituição de explorações livres de neosporose e com bom desempenho reprodutivo (Dubey *et al*, 2007).
- Testagem dos animais antes da sua entrada na exploração (Dubey *et al*, 2007).
- Uso de vedações na exploração que não permitam a entrada de outros animais, principalmente cães (Dubey *et al*, 2007). Este é um factor bastante relevante, principalmente porque os cães recém-introduzidos excretam uma maior quantidade de oocistos, podendo levar a novos surtos em explorações com neosporose endémica (Dijkstra *et al*, 2002b).
- Controlo regular de roedores (Dubey *et al*, 2007).
- Evitar potenciais factores de recrudescência de neosporose, como o stress (Dubey *et al*, 2007), embora o controlo destes factores seja bastante complexo.
- Utilizar, quando possível, o sêmen de machos de aptidão cárnea, principalmente de raça *Limousine* (Nogareda *et al*, 2009). Nas explorações de leite, uma vez que o seu objectivo é a obtenção de novilhas de substituição com alto potencial de produção leiteiro, a aplicação desta medida é difícil.
- Refugar os animais seropositivos (Dubey *et al*, 2007).
- Realizar serologias anuais à totalidade dos animais da exploração, excepto aqueles com idade inferior a 6 meses (Nogareda *et al*, 2009).

Um estudo realizado na Suíça, onde a seroprevalência de *N. caninum* ronda os 12%, compara quatro diferentes estratégias de controlo: a testagem e refugo dos animais seropositivos; a não colocação, em reprodução, de filhas de vacas seropositivas; o tratamento quimioterápico dos vitelos filhos de vacas seropositivas; e a vacinação dos animais infectados e susceptíveis à infecção. A primeira modalidade leva a uma diminuição da prevalência de 12% para menos de 1% no primeiro ano. As restantes hipóteses apresentadas diminuem a prevalência para menos de 2% em 11, 23 e 3 anos, respectivamente. Como é óbvio, estes resultados dependem de vários factores, como a via de transmissão predominante e a eficácia do tratamento e vacinação. Este estudo conclui ainda que só é possível a erradicação da neosporose quando a transmissão horizontal for interrompida (Hasler, Stark, Sager, Gottstein & Reist, 2006b). Apesar do refugo sistemático se apresentar altamente eficaz, antes da implementação de quaisquer medidas, deve ser realizada uma análise custo-benefício. Larson, Hardin e Pierce (2004) analisaram, em explorações de bovinos de aptidão carne com neosporose endémica, três diferentes estratégias de controlo: o refugo dos animais com falha reprodutiva; a venda das fêmeas seropositivas, com consequente compra de novilhas de substituição seronegativas; e a realização de uma serologia a todos os animais da exploração, excluindo da reprodução a descendência das vacas seropositivas. Os autores observaram que o retorno económico era maior quando se utilizava a última estratégia (Larson *et al*, 2004). Estas diferentes estratégias devem, como é óbvio, ser aplicadas em explorações onde a via de transmissão predominante é a vertical. Um outro estudo realizado na Suíça por Hasler e colegas (2006a), em explorações leiteiras, refere que a neosporose causa, em média, uma perda económica anual de 9,7 milhões de euros, estando as perdas mais importantes relacionadas com os abortos e com a diminuição da produção leiteira. Este estudo refere que as estratégias de controlo que requerem serologias anuais são economicamente inviáveis e apresenta como melhor estratégia a não colocação em reprodução de fêmeas descendentes de vacas seropositivas (esta requer pelo menos uma serologia, pelo que existe um custo inicial elevado), o que corrobora o estudo referido anteriormente, realizado por Larson e colegas (2004). O refugo de todos os animais seropositivos, apesar da sua eficácia, não é economicamente viável, principalmente em explorações em que a prevalência é elevada. A vacinação, apesar de reduzir as perdas económicas, não é um método aceitável do ponto de vista económico, uma vez que os custos do produto e também do veterinário excedem largamente os seus benefícios (Hasler *et al*, 2006a). Além disso, actualmente, nenhuma vacina previne ainda a infecção transplacentária (Dubey *et al*, 2007) e a sua eficácia varia bastante de exploração para exploração (Parkinson, 2009b). A vacina existente, *Bovilis Neoguard*[®], diminui em apenas 50% a incidência de

abortos (Reichel, 2008). O tratamento de todas as fêmeas sem testar previamente as suas mães é a escolha economicamente mais atractiva, no entanto, actualmente, subsistem várias dúvidas relativamente à eficácia e protocolo dos tratamentos (Hasler *et al*, 2006a). Outro estudo, realizado por Reichel e Ellis (2006) analisa, tendo em conta a situação das explorações leiteiras na Austrália e Nova Zelândia, quatro hipóteses de controlo: testagem e refugo, tratamento com um quimioterápico, vacinação e não fazer nada. Neste estudo os autores concluíram que se a análise custo-benefício tiver em consideração apenas um ano, e a seroprevalência da exploração for, no máximo, 18%, não fazer nada é a opção economicamente ideal. Esta também é a escolha de eleição caso a exploração apresente uma seroprevalência até aos 21%, e os custos sejam analisados para um período de 5 anos. Se a seroprevalência for superior aos 21%, a vacinação é elegida como a opção mais económica. A testagem e refugo, assim como o tratamento, não são apresentadas como opções economicamente interessantes. No futuro, quando as vacinas se apresentarem mais eficazes na prevenção da infecção/abortos, a vacinação será a opção economicamente mais atractiva no caso da seroprevalência apresentar um valor superior a 4,5%. Através da análise dos resultados obtidos nos diferentes estudos, pode compreender-se que as viabilidades das estratégias de controlo são distintas, pelo que as opções devem, obviamente, ser adaptadas a cada caso.

Vários estudos referem que o uso de sémen de touros de aptidão cárnea para inseminação de vacas leiteiras seropositivas reduz significativamente a taxa de abortos, referindo que algumas raças podem ser mais resistentes à infecção por *N. caninum* e ao aborto (Almería *et al*, 2009). Almería e colegas (2009) realizaram um estudo em Espanha onde compararam a taxa de abortos em vacas Holstein-Frísias inseminadas com sémen de touros de diferentes raças. Este estudo permitiu concluir que as taxas mais baixas de aborto (2,1%) eram encontradas em vacas com baixos títulos de anticorpos inseminadas com sémen de touros *Limousine*. Esta percentagem de abortos é similar à observada em explorações sem neosporose. Alguns estudos anteriores demonstram também que a raça *Limousine* apresenta uma menor seroprevalência de neosporose (Armengol *et al*, 2007, citado por Almería *et al*, 2009). O uso de sémen de touros raça BB (*Belgian Blue*) leva a um aumento do risco de aborto em vacas com baixos títulos de anticorpos (Almería *et al*, 2009). Isto pode ser explicado pela proximidade genética desta raça com a Holstein-Frísia, comparativamente à raça *Limousine*, Charolesa e Piedmontesa (Blott, Williams & Haley, 1998, citado por Almería *et al*, 2009). Estes resultados podem ser compreendidos pelo facto de o uso de cruzamentos favorecer a função placentária, devido a um aumento das PAGs (glicoproteínas associadas à gestação)

(Dubey *et al*, 2007). Estas PAGs apresentam propriedades imunossupressivas quando secretadas a nível intra-uterino (Wooding, Roberts & Green, 2005, citado por Serrano *et al*, 2009). Assim, altas concentrações plasmáticas destas glicoproteínas podem reflectir mecanismos placentários necessários para evitar a rejeição materna, compensando a distância genética entre as raças (Serrano *et al*, 2009), pelo que quanto maior a distância entre os genes fetais e maternos, maiores as concentrações das PAGs (López-Gatius *et al*, 2005). Este processo parece ser de extrema importância no reforço da barreira placentária contra alguns agentes infecciosos que apresentam transmissão transplacentária, como *N. caninum*. Sabe-se também que baixas secreções das PAGs durante a gestação podem reflectir baixa vascularização placentária, principalmente numa fase mais precoce da placentação. Foi provado também que o uso de sémen *Limousine* leva a um aumento da concentração plasmática, durante a gestação, da PAG-1 (Serrano *et al*, 2009), o que explica os resultados obtidos por Almería e colegas (2009). Almería e colegas (2009) observaram ainda que as taxas de abortos em gestações resultantes de cruzamentos se encontravam dependentes dos títulos de anticorpos maternos, sendo esta taxa mais baixa quanto mais baixos eram estes títulos, mesmo quando era usado sémen *Limousine*. Os títulos de anticorpos podem assim servir como uma ferramenta predictiva do risco de aborto em explorações com elevada seroprevalência. Este artigo apresenta como estratégia de controlo, em explorações leiteiras com elevada seroprevalência, o uso de IA com sémen *Limousine* em vacas seropositivas. Deste modo, excluem-se da reprodução as fêmeas descendentes de vacas seropositivas, permitindo diminuir a seroprevalência de *N. caninum* e a taxa de aborto, aumentando o número de lactações completas nas vacas seropositivas e aumentando o retorno económico com a venda da descendência proveniente dos cruzamentos (Almería *et al*, 2009). Esta estratégia apresenta-se bastante atractiva, podendo ser aplicada na exploração em questão, no entanto, neste momento, devido à situação em que se encontra o sector leiteiro, o produtor opta por não comprar novilhas de substituição, sendo necessária a inclusão, na reprodução, das filhas das vacas presentes na exploração. No entanto, caso seja possível, esta deveria ser uma das medidas adoptadas, conjuntamente com as medidas apresentadas anteriormente. No caso da adopção desta medida, poderia não ser necessário a realização de serologias anuais à totalidade do efectivo, sendo realizada apenas uma serologia inicial e a testagem das novilhas de substituição adquiridas.

Prevalências de neosporose:

Foram já descritas as prevalências de neosporose em alguns países. Na Suíça e na Suécia, as seroprevalências, em vacas leiteiras, são relativamente baixas, rondando os 12% (Hasler *et al*, 2006b) e os 2% (Bjorkman *et al*, 2000), respectivamente. Em Inglaterra e no País de Gales, a seroprevalência em vacas abortadas é de 18% e em vacas não abortadas de 6%. Pensa-se também que 12,5% dos abortos ocorridos nestes países sejam causados por este parasita (Davison, Otter & Trees, 1999b). Um outro estudo, realizado em Espanha, demonstra uma prevalência individual de 17,9% em vacas de carne e de 35,9% em vacas de leite (Quintanilla-Gozalo *et al*, 1999). Pereira-Bueno e colegas, em 2003, realizaram outro estudo, no mesmo país, para inferirem acerca da participação deste parasita nos abortos bovinos ocorridos, chegando à conclusão que 38,8% dos fetos abortados analisados eram positivos a *N. caninum*. No México, a prevalência corresponde a 42%, e 26% dos abortos ocorridos no país são atribuídos ao parasita (Garcia-Vasquez, Rosario-Cruz, Ramos-Aragon, Cruz-Vasquez & Mapes-Sanchez, 2005). No Sul do Brasil, foi também realizado um estudo em que analisaram fetos bovinos abortados, concluindo que 23% dos fetos se encontravam infectados por *N. caninum*. A prevalência de fetos infectados provenientes de vacas com ou sem história de aborto era de 44% e 24,4%, respectivamente (Corbellini *et al*, 2006a). Um estudo realizado em Portugal permitiu concluir que a seroprevalência, calculada em animais existentes em explorações com história prévia de aborto endémico ou epidémico, corresponde a 46%. O mesmo estudo demonstrou que 36% dos fetos abortados analisados apresentavam infecção pelo parasita (Canada *et al*, 2004). Esta prevalência é semelhante à encontrada em Espanha (Quintanilla-Gozalo *et al*, 1999). Isto é reflexo, provavelmente, da proximidade geográfica e das trocas comerciais de vacas e novilhas entre os dois países. As prevalências obtidas na exploração analisada são superiores às apresentadas no estudo realizado em Portugal. Através da análise das prevalências dos diferentes países, pode ser verificado que os países com temperaturas mais baixas, como a Suécia, a Suíça, a Inglaterra e o País de Gales, apresentam seroprevalências mais baixas, quando comparadas com as encontradas em países com climas mais temperados/quentes, como Portugal, Espanha, México e Brasil. Este facto pode estar relacionado com a temperatura de esporulação dos *occistos* pois, actualmente, pensa-se que a esporulação seja favorecida por temperaturas altas (Dubey *et al*, 2007).

3.5. Conclusão

O aborto bovino causa perdas económicas importantes, tendo um efeito profundo a nível da economia e produtividade das explorações. Uma vez que os agentes passíveis de causar aborto nesta espécie são diversos, o seu diagnóstico é complexo. É necessário ter ainda em consideração que, por vezes, a causa não é infecciosa, o que torna o diagnóstico ainda mais difícil.

Nesta exploração, o parasita *N. caninum* teve consequências profundas, pelo que a eficiência produtiva e reprodutiva da exploração em questão ficaram bastante afectadas. O parasita apresenta um impacto profundo no intervalo entre partos, tendo sido verificado que os animais seropositivos, assim como os que sofreram aborto, apresentam um prolongamento importante deste parâmetro. Como consequência, o intervalo entre partos da exploração encontra-se bastante aumentado (481 dias), o que afecta em grande escala a economia da exploração.

As medidas tomadas no ano de 2008 permitiram diminuir a prevalência do parasita em 27%, tendo diminuído também a incidência dos abortos (em 2010 não foram verificados quaisquer abortos). Novas medidas poderiam ser tomadas, no entanto, devido aos abortos, ao aumento do intervalo entre partos e à diminuição de número de vitelas, actualmente existem poucas novilhas de substituição. Como referido anteriormente, devido à situação actual do sector do leite, torna-se pouco viável a tomada de novas medidas, pois é sempre necessário algum investimento inicial, porém, só uma análise custo-benefício permitiria concluir quais as medidas mais viáveis. Caso fosse possível, o mais exquível seria a compra de novos animais, realizando serologias antes da sua entrada na exploração e incluindo nas novilhas de substituição apenas aquelas descendentes de vacas seronegativas. Os descendentes de vacas seropositivas poderiam ser inseminados com sémen *Limousine*, o que diminuiria as perdas económicas causadas pelo parasita.

A espécie *N. caninum* é cada vez mais um problema das explorações portuguesas, causando perdas económicas avultadas, pelo que os veterinários clínicos, quando deparados com surtos de abortos devem incluir, de forma sistemática, pela sua frequência e gravidade, a neosporose no diagnóstico diferencial de aborto bovino. O médico veterinário deve expor ao produtor as consequências da neosporose e, em conjunto, devem chegar a um acordo sobre quais as medidas a aplicar. É preciso não esquecer que muitas das medidas aqui expostas não são realisticamente aplicáveis em muitas das explorações portuguesas, sendo por vezes preferível conviver com o problema ao invés do erradicar pois, frequentemente, os custos sobrepõem-se aos benefícios.

Bibliografía

- Abbitt, B. & Radse, D. O. (2007). Protozoal abortion in cattle. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology* 2. (2nd ed.). (pp. 409-413). St. Louis: Saunders.
- Almería, S., López-Gatius, F., García-Ispuerto, I., Nogareda, C., Bech-Sàbat, G., Serrano, B., Santolaria, P. & Yániz, J. L. (2009). Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. *Veterinary Parasitology*, 163, 323-329.
- Álvarez-García, G., Pereira-Bueno, J., Gómez-Bautista, M. & Ortega-Mora, L. M. (2002). Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. *Veterinary Parasitology*, 107, 15-27.
- Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Costas, E., Rebordosa, X. & Ortega-Mora, L. M. (2003). Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Veterinary Research*, 34, 341-352.
- Anderson, M. L., Palmer, C. W., Thurmond, M. C., Picanso, J. P., Blanchard, P. C., Breitmeyer, R. E., Layton, A. W., McAllister, M., Daft, B., Kinde, H., Read, D. H., Dubey, J. P., Conrad, P. A. & Barr, B. C. (1995). Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 207, 1206-1210.
- Anderson, M. L. (2007). Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology*, 68, 474-486.
- Baillargeon, P., Fecteau, G., Paré, J., Lamothe, P. & Sauvé, R. (2001). Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 218, 1803-1806.
- Barling, K. S., McNeill, J. W., Paschal, J. C., McCollum III, F. T., Craig, T. M., Adams, L. G. & Thompson, J. A. (2001). Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 52, 53-61.
- Barr, B. C., Conrad, P. A., Dubey, J. P. & Anderson, M. L. (1991a). Neospora-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3, 39-46.
- Barr, B. C., Anderson, M. L., Dubey, J. P. & Conrad, P. A. (1991b). Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Veterinary Pathology*, 28, 110-116.
- Barr, B. C., Anderson, M. L., Woods, L. W., Dubey, J. P. & Conrad, P. A. (1992). Neospora-like protozoal infections associated with abortion in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4, 365-367.

- Barrat-Boyes, S. M. & MacLachlan, N. J. (1995). Pathogenesis of bluetongue virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 206, 1322-1329.
- Barrett, D. C., Boyd, H. & Mihm, M. (2004). Failure to conceive and embryonic loss. In A. H. Andrews, R. W. Blowey, H. Boyd & R. G. Eddy, *Bovine medicine diseases and husbandry of cattle*, (2nd ed.). (pp. 552- 576). Oxford: Blackwell Science.
- Bartels, C. J. M., Wouda, W. & Schukken, Y. H. (1999). Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). *Theriogenology*, 52, 247-257.
- Bartels, C. J. M., Arnaiz-Seco, J. J., Ruiz-Santa-Quitera, A., Bjorkman, C., Frossling, J., von Blumroder, D., Conraths, F. J., Schares, G., van Maanen, C., Wouda, W. & Ortega-Mora, L. M. (2006). Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Veterinary Parasitology*, 137, 17-27.
- Bjorkman, C., Alenius, S., Emanuelsson, U. & Uggla, A. (2000). *Neospora caninum* and Bovine Virus Diarrhoea Virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *The Veterinary Journal*, 159, 201-206.
- Bjorkman, C., McAllister, M. M., Frossling, J., Naslund, K., Leung, F. & Uggla, A. (2003). Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15, 3-7.
- Blowey, R.W. (1999). Fertility and its control. In R. W. Blowey, *A veterinary book for dairy farmers*, (3th ed.). (pp. 231-278). Ipswich: Old Pond Publishing.
- Boger, L. A. & Hattel, A. L. (2003). Additional evaluation of undiagnosed bovine abortion cases may reveal fetal neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 113, 1-6.
- Cabell, E. (2007). Bovine abortion: aetiology and investigations. *In Practice*, 29, 455-463.
- Caldow, G. & Gray, D. (2004). Fetal loss. In A. H. Andrews, R. W. Blowey, H. Boyd & R. G. Eddy, *Bovine medicine diseases and husbandry of cattle*, (2nd ed.). (pp. 577- 589). Oxford: Blackwell Science.
- Canada, N., Carvalheira, J., Meireles, C. S., Costa, J. M. C. & Rocha, A. (2004). Prevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cows and its consequences for reproductive management. *Theriogenology*, 62, 1229-1235.
- Collett, M. S., Anderson, D. K. & Retzel, E. (1988). Comparisons of the Pestivirus bovine viral diarrhoea virus with the members of the Flaviviridae. *The Journal of General Virology*, 69, 2637-2643.
- Conraths, F. J. & Gottstein, B. (2007). Aetiological diagnosis. In L. M. Ortega-Mora, B. Gottstein, F. J. Conraths & D. Buxton, *Protozoal Abortion in Farm Ruminants*, (pp. 42-121). Cambridge: CAB International.

- Corbellini, L. G., Driemeier, D., Cruz, C. F. E., Gondim, L. F. P. & Wald, V. (2002). Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 103, 195-202.
- Corbellini, L. G., Pescador, C. A., Frantz, F., Wunder, E., Steffen, D., Smith, D. R. & Driemeier, D. (2006a). Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. *The Veterinary Journal*, 172, 114-120.
- Corbellini, L. G., Smith, D. R., Pescador, C. A., Schmitz, M., Correa, A., Steffen, D. J. & Driemeier, D. (2006b). Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 74, 130-141.
- Davison, H. C., Otter, A. & Trees, A. J. (1999a). Estimation of vertical and horizontal parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology*, 29, 1683-1689.
- Davison, H. C., Otter, A. & Trees, A. J. (1999b). Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *International Journal for Parasitology*, 29, 1189-1194.
- Davison, H. C., Guy, C. S., McGarry, J. W., Guy, F., Williams, D. J. L., Kelly, D. F. & Trees, A. J. (2001). Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Research in Veterinary Science*, 70, 163-168.
- De Meerschman, F., Speybroeck, N., Berkvens, D., Rettigner, C., Focant, C., Leclipteux, T., Cassart, D. & Losson, B. (2002). Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy cattle and beef cattle in Belgium. *Theriogenology*, 58, 933-945.
- Dijkstra, T., Barkema, H. W., Eysker, M., Hesselink, J. W. & Wouda, W. (2002a). Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Veterinary Parasitology*, 105, 99-104.
- Dijkstra, T., Barkema, H. W., Hesselink, J. W. & Wouda, W. (2002b). Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Veterinary Parasitology*, 105, 89-98.
- Dijkstra, T., Barkema, H. W., Eysker, M., Beiboer, M. L. & Wouda, W. (2003). Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Veterinary Parasitology*, 110, 161-169.
- Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J. & Uggla, A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192, 1269-1285.
- Dubey, J. P. (1999a). Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214, 1160-1163.
- Dubey, J. P. (1999b). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 84, 349-367.

- Dubey, J. P., Barr, B. C., Barta, J. R., Bjerkås, I., Bjorkman, C., Blagburn, B. L., Bowman, D. D., Buxton, D., Ellis, J. T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D. E., Howe, D. K., Jenkins, M. C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A. E., Mattsson, J. G., McAllister, M. M., Modrý, D., Omata, Y., Sibley, L. D., Speer, C. A., Trees, A. J., Uggla, A., Upton, S. J., Williams, D. J. L. & Lindsay, D. S. (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*, 32, 929-946.
- Dubey, J. P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, 41, 1-16.
- Dubey, J. P., Sreekumar, C., Knickman, E., Miska, K. B., Vianna, M. C. B., Kwok, O. C. H., Hill, D. E., Jenkins, M. C., Lindsay, D. S. & Greene, C. E. (2004). Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *International Journal for Parasitology*, 34, 1157-1167.
- Dubey, J. P. (2004). Neosporosis. In J. A. W. Coetzer & R. C. Tustin, *Infectious diseases of livestock*, (Vol. I, 2nd ed.). (pp. 382-393). Oxford: Oxford University Press.
- Dubey, J. P. (2005). Neosporosis in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 21, 473-483.
- Dubey, J. P. & Schares, G. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 140, 1-34.
- Dubey, J. P. & Lindsay, D. S. (2006). Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 22, 645-671.
- Dubey, J. P., Buxton, D. & Wouda, W. (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*, 134, 267-289.
- Dubey, J. P., Schares, G. & Ortega-Mora, L. M. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 323-367.
- Esslemont, R. J. (1992). Measuring dairy herd fertility. *The Veterinary Record*, 5, 209-212.
- Ferre, I., Aduriz, G., del-Pozo, I., Regidor-Cerrillo, J., Atxaerandio, R., Collantes-Fernández, E., Hurtado, A., Ugarte-Garagalza, C. & Ortega-Mora, L. M. (2005). Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology*, 63, 1504-1518.
- Fioretti, D. P., Pasquai, P., Diaferia, M., Mangili, V. & Rosignoli, L. (2003). *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *Journal of Veterinary Medicine B*, 50, 399-404.
- Garcia-Vazquez, Z., Rosario-Cruz, R., Ramos-Aragon, A., Cruz-Vazquez, C. & Mapes-Sanchez, G. (2005). *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 134, 61-65.
- Garry, F. (2008). Miscellaneous infectious diseases. In T. J. Divers & S. F. Peek, *Rebhun's diseases of dairy cattle*, (2nd ed.). (pp. 606-650). St. Louis: Saunders Elsevier.

- Givens, M. D. & Marley, M. S. D. (2008). Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, 70, 270-285.
- Godfroid, J., Bosman, P. P., Herr, S. & Bishop, G. C. (2004). Bovine brucellosis. In J. A. W. Coetzer & R. C. Tustin, *Infectious diseases of livestock*, Vol. III (2nd ed.). (pp. 1510-1527). Oxford: Oxford University Press.
- Godim, L. F. P., McAllister, M. M., Pitt, W. C. & Zemlicka, D. E. (2004). Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 34, 159-161.
- Godim, L. F. P., McAllister, M. M. & Gao, L. (2005). Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Veterinary Parasitology*, 134, 33-39.
- Grooms, D. L. (2004). Reproductive consequences of infection with bovine abortion with bovine diarrhoea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20, 5-19.
- Guarino, A., Fusco, G., Savini, G., Di Francesco, G. & Cringoli, G. (2000). Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *Veterinary Parasitology*, 91, 15-21.
- Guy, C. S., Williams, D. J. L., Kelly, D. F., McGarry, J. W., Guy, F., Bjorkman, C., Smith, R. F. & Trees, A. J. (2001). *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *The Veterinary Record*, 149, 443-449.
- Hall, C. A., Reichel, M. P. & Ellis, J. T. (2005). *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Veterinary Parasitology*, 128, 231-241.
- Hasler, B., Regula, G., Stark, K. D. C., Sager, H., Gottstein, B. & Reist, M. (2006a). Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*, 77, 230-253.
- Hasler, B., Stark, K. D. C., Sager, H., Gottstein, B. & Reist, M. (2006b). Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 77, 254-283.
- Hemphill, A., Gottstein, B., Conraths, F. J., De Meerschman, F., Ellis, J. T., Innes, E. A., McAllister, M. M., Ortega-Mora, L. M., Tenter, A. M., Uggla, A., Williams, D. J. L. & Wouda, W. (2000). A European perspective on *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 30, 877-924.
- Hillman, R. & Gilbert, R. O. (2008). Reproductive diseases. In T. J. Divers & S. F. Peek, *Rebhun's diseases of dairy cattle*, (2nd ed.). (pp. 395-446). St. Louis: Saunders Elsevier.
- Hobson, J. C., Duffield, T. F., Kelton, D., Lissemore, K., Hietala, S. K., Leslie, K. E., McEwen, B., Cramer, G. & Peregrine, A. S. (2002). *Neospora caninum* serostatus and

milk production of Holstein cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 221, 1160-1164.

- Hobson, J. C., Duffield, T. F., Kelton, D., Lissemore, K., Hietala, S. K., Leslie, K. E., McEwen, B. & Peregrine, A. S. (2005). Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Veterinary Parasitology*, 127, 177-188.
- Hubbert, W. T., Dennis, S. M., Adams, W. M., Bierschwal, C. J., Biggers, J. D., Carrol, E. J., Dunne, H. W., Hutton, N. E., Kendrick, J. W., Kenney, R. M., Kirkham, W. W., Leipold, H. W., Lingard, D. R., McDonald, L. E., Miner, M. L., Mossman, H. W., Murdick, P. W., Oberst, F. H., Priester, W. A., Ramge, J. C., Simon, J., Smith, R. E., Swift, B. L., Wagner, W. C., Williams, E. I. & Zemjanis, R. (1972). Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Veterinarian*, 62, 216-237.
- Innes, E. A., Wright, S. E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I. M. & Buxton, D. (2001). Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, 31, 1523-1534.
- Innes, E. A., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macaldowie, C., Esteban-Redondo, I. & Buxton, D. (2005). The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108, 29-36.
- Inskeep, E. K. & Dailey, R. A. (2005). Embryonic death in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 21, 437- 461.
- Jainudeen, M. R. & Hafez, E. S. E. (2000). Reproductive failure in females. In E. S. E. Hafez & B. Hafez, *Reproduction in farm animals*, (7th ed.). (pp. 261-278). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Janzen, E. D., Cates, W. F., Barth, A., Nechala, L., Pawlyshyn, V., Saunders, J. R. & Osborne, A. D. (1981). Prevalence of *Haemophilus somnus* in the semen of bulls in Saskatchewan. *The Canadian Veterinary Journal*, 22, 361-362.
- Kashiwazaki, Y., Giannechini, R. E., Lust, M. & Gil, J. (2004). Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, 120, 139-144.
- Kelling, C. L., Stine, C. S., Rump, K. K., Parker, R. E., Kennedy, J. E., Stone, R. T. & Ross, G. S. (1990). Investigation of bovine viral diarrhea virus infections in a range beef cattle herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 5, 589-593.
- Kelling, C. L. (2007). Viral diseases of the fetus. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology* 2. (2nd ed.). (pp. 399-408). St. Louis: Saunders.
- Kritzner, S., Sager, H., Blum, J., Krebber, R., Greif, G. & Gottstein, B. (2002). An explorative study to assess the efficacy of Toltrazuril-sulfone (ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2002, 1, 1-10.

- Larson, R. L., Hardin, D. K. & Pierce, V. L. (2004). Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 224, 1597-1604.
- Lee, J. I. & Kim, I. H. (2007). Pregnancy loss in dairy cows: the contributing factors, the effects on reproductive performances and the economic impact. *Journal of Veterinary Science*, 8, 283- 288.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P. & Duncan, R. B. (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 82, 327-333.
- Livingstone, M. & Longbottom, D. (2006). What is the prevalence and economic impact of chlamydial infections in cattle? The need to validate and harmonise existing methods of detection. *The Veterinary Journal*, 172, 3-5.
- López-Gatius, F., Pabón, M. & Almería, S. (2004). *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 62, 606-613.
- López-Gatius, F., Santolaria, P., Yániz, J. L., Garbayo, J. M. & Almería, S. (2005). The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. *Journal of Veterinary Medicine B*, 52, 88-92.
- McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A. & McGuire, A. M. (1998a). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 28, 1473-1478.
- McAllister, M. M., Jolley, W. R., Wills, R. A., Lindsay, D. S., McGuire, A. M. & Tranas, J. D. (1998b). Oral inoculation of cats with tissue cysts of *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research*, 59, 441-444.
- McAllister, M. M., Bjorkman, C., Anderson-Sprecher, R. & Rogers, D. G. (2000). Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217, 881-887.
- Metre, D. C. V., Tennant, B. C. & Whitlock, R. H. (2008). Infectious diseases of the gastrointestinal tract. In T. J. Divers & S. F. Peek, *Rebhun's diseases of dairy cattle*, (2nd ed.). (pp. 200-294). St. Louis: Saunders Elsevier.
- Moore, D. P., Odéon, A. C. & Campero, C. M. (2001). Neosporosis bovina: una actualización. *Veteriaria Argentina*, 18, 752-775.
- Moskwa, B., Pastusiak, K., Bien, J. & Cabaj, W. (2007). The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitology Research*, 100, 633-636.
- Noakes, D.E. (2009). Normal cyclical ovarian activity and its control. In D. E. Noakes, T. J. Parkinson & G. C. W. England, *Veterinary reproduction and obstetrics*. (9th ed.). (pp. 3-58). London: Saunders Elsevier.

- Nogareda, C., López-Gatius, F., García-Ispuerto, I., Pablón, M., Bech-Sabat, G., Santolaria, P., Yániz, J. L. & Almería, S. (2009). Neosporosis bovina en explotaciones de alta producción lechera del nordeste de España. Apoyo laboratorial y perspectiva clínica. *Boletín de anemle*, 84, 10-16.
- Ortega-Mora, L. M., Fernández-García, A. & Gómez-Bautista, M. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. *Acta Parasitologica*, 51, 1-14.
- Otranto, D., Llazari, A., Testini, G., Traversa, D., di Regalbono, A. F., Badan, M. & Capelli, G. (2003). Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Veterinary Parasitology*, 118, 7-18.
- Pabón, M., López-Gatius, F., García-Ispuerto, I., Bech-Sàbat, G., Nogareda, C. & Almería, S. (2007). Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3 year study. *Veterinary Parasitology*, 147, 40-46.
- Paré, J., Fecteau, G., Fortin, M. & Marsolais, G. (1998). Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 213, 1595-1598.
- Parkinson, T. (2009a). Infertility and subfertility in the cow: structural and functional abnormalities, management deficiencies and non-specific infections. In D. E. Noakes, T. J. Parkinson & G. C. W. England, *Veterinary reproduction and obstetrics*. (9th ed.). (pp.393-475). London: Saunders Elsevier.
- Parkinson, T. (2009b). Specific infectious diseases causing infertility and subfertility in cattle. In D. E. Noakes, T. J. Parkinson & G. C. W. England, *Veterinary reproduction and obstetrics*. (9th ed.). (pp. 476-516). London: Saunders Elsevier.
- Parkinson, T. & Barret, D. (2009). Veterinary control of herd fertility. In D. E. Noakes, T. J. Parkinson & G. C. W. England, *Veterinary reproduction and obstetrics*. (9th ed.). (pp. 517-558). London: Saunders Elsevier.
- Perdrizet, J. A., Rebhun, W. C., Dubovi, E. J. & Donis, R. O. (1987). Bovine virus diarrhea – clinical syndromes in dairy cattle. *The Cornell Veterinarian*, 77, 46-74.
- Peregrine, A. S., Martin, S. W., Hopwood, D. A., Duffield, T. F., McEwen, B., Hobson, J. C. & Hietala, S. K. (2006). *Neospora caninum* and *Leptospira* serovar serostatus in dairy cattle in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal*, 47, 467-470.
- Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozalo, A., Pérez-Pérez, V., Espi-Felgueroso, A., Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E. & Ortega-Mora, L. M. (2003). Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 111, 143-152.
- Peters, M., Lütkefels, E., Heckeroth, A. R. & Schares, G. (2001). Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, 31, 1144-1148.

- Quintanilla-Gozalo, A., Pereira-Bueno, J., Tabarés, E., Innes, E. A., González-Paniello, R. & Ortega-Mora, L. M. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *International Journal for Parasitology*, 29, 1201-1208.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. (2007a). Diseases associated with bacteria – III. In O. M. Radostits, C. C. Gay, K. W. Hinchcliff & P. D. Constable, *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (10th ed.). (pp. 847-1006). London: Saunders Elsevier.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. (2007b). Diseases associated with bacteria – V. In O. M. Radostits, C. C. Gay, K. W. Hinchcliff & P. D. Constable, *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (10th ed.). (pp. 1061-1156). London: Saunders Elsevier.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. (2007c). Diseases associated with viruses and Chlamydia – I. In O. M. Radostits, C. C. Gay, K. W. Hinchcliff & P. D. Constable, *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (10th ed.). (pp.1157-1306). London: Saunders Elsevier.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. (2007d). Diseases associated with viruses and Chlamydia – II. In O. M. Radostits, C. C. Gay, K. W. Hinchcliff & P. D. Constable, *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (10th ed.). (pp. 1307-1438). London: Saunders Elsevier.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P. D. (2007e). Diseases associated with protozoa. In O. M. Radostits, C. C. Gay, K. W. Hinchcliff & P. D. Constable, *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (10th ed.). London: Saunders Elsevier.
- Reichel, M. P. (2008). Re-evaluating the economics of neosporosis control. *Veterinary Parasitology*, 156, 361-362.
- Reichel, M. P. & Ellis, J. T. (2006). If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Veterinary Parasitology*, 142, 23-34.
- Reitt, K., Hilbe, M., Voegtlin, A., Corboz, L., Haessig, M. & Pospischil, A. (2007). Aetiology of bovine abortion in Switzerland from 1986-1995 – a retrospective study with emphasis on detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR. *Journal of Veterinary Medicine A*, 54, 15-22.
- Rinaldi, L., Fusco, G., Musella, V., Veneziano, V., Guarino, A., Taddei, R. & Cringoli, G. (2005). *Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. *Veterinary Parasitology*, 128, 219-230.
- Rinaldi, L., Pacelli, F., Lovane, G., Pagnini, U., Veneziano, V., Fusco, G. & Cringoli, G. (2007). Survey of *Neospora caninum* and bovine herpes virus 1 coinfection in cattle. *Parasitology Research*, 100, 359-364.

- Robinson, R. S., Mann, G. E., Lamming, G. E. & Wathes, D. C. (1999). The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *Journal of Endocrinology*, 160, 21- 33.
- Rodriguez, S. H., Moreno, A. J. M. & Palomino, P. N. G. (1999). Neosporosis. In M. C. Campillo, F. A. R. Vazquez, A. R. M. Fernandez, M. C. S. Acedo, S. H. Rodriguez, I. N. Lopez-Cozar, P. D. Baños, H. Q. Romeno & M. C. Varela, *Parasitología Veterinaria*, (pp. 330-332). Madrid: McGraw-Hill-Interamericana.
- Sanderson, M. W., Gay, J. M. & Baszler, T. V. (2000). *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Veterinary Parasitology*, 90, 15-24.
- Schwartz-Cornil, I., Mertens, P. P. C., Contretas, V., Hemati, B., Pascale, F., Bréard, E., Mellor, P.S., MacLachlan, N. J. & Zientara, S. (2008). Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary Research*, 39, 1-16.
- Serrano, B., López-Gatius, F., Santolaria, P., Almería, S., García-Ispuerto, I., Bech-Sabat, G., Sulon, J., Sousa, N. M., Beckers, J. F. & Yániz, J. L. (2009). Factors affecting plasma pregnancy-associated glycoprotein 1 concentrations throughout gestation in high-producing dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 600-605.
- Serrano-Martínez, E., Ferre, I., Martínez, A., Osoro, K., Mateos-Sanz, A., del-Pozo, I., Aduriz, G., Tamargo, C., Hidalgo, C. O. & Ortega-Mora, L. M. (2007). Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology*, 67, 1175-1184.
- Silke, V., Diskin, M. G., Kenny, D. A., Boland, M. P., Dillon, P., Mee, J. F. & Sreenan J. M. (2002). Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 71, 1-12.
- Stevenson, J. S. (2007). Clinical reproductive physiology of the cow. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology* 2. (2nd ed.). (pp. 258-270). St. Louis: Saunders.
- Thurmond, M. C. & Hietala, S. K. (1997). Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 58, 1381-1385.
- Tranas, J., Heinzen, R. A., Weiss, L. M. & McAllister M. M. (1999). Serological evidence of human infectin with the protozoan *Neospora caninum*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6, 765-767.
- Trees, A. J., Davison, H. C., Innes, E. A. & Wastling, J. M. (1999). Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, 29, 1195-1200.
- Trees, A. J. & Williams D. J. L. (2005). Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *TRENDS in Parasitology*, 21, 558-561.

- Troedsson, M. H. T. (2002). Alterations in sexual function. In B. P. Smith, *Large animal internal medicine*, (3th ed.). (pp. 207-232). St. Louis: Mosby.
- Van der Walt, M. L. (2004). *Campylobacter jejuni* infection. In J. A. W. Coetzer & R. C. Tustin, *Infectious diseases of livestock*, Vol. III (2nd ed.). (pp. 1479-1483). Oxford: Oxford University Press
- VanLeeuwen, J. A., Haddad, J. P., Dohoo, L. R., Keefe, G. P., Tiwari, A. & Scott, H. M. (2010). Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 93, 129-138.
- Veling, J., Van Zijderveld, F. G., Van Zijderveld, A. M., Van Bommel, Barkema, H. W. & Schukken, Y. H. (2000). Evaluation of three newly developed enzyme-linked immunosorbent assays and two agglutination tests for detecting *Salmonella enteric* subsp. *enterica* serovar Dublin infections in dairy cattle. *American Society for Microbiology*, 32, 4402-4407
- Veterinary Investigation Diagnosis Analysis. (2008). *Veterinary Laboratories Agency*. Addlestone: VIDA.
- Waldner, C. L., Janzen, E. D. & Ribble, C. S. (1998). Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 213, 685-690.
- Walker, R. L. (2007). Mycotic bovine abortion. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology* 2. (2nd ed.). (pp. 417-419). St. Louis: Saunders.
- Ward, A. C. S., Jaworski, M. D., Eddow, J. M. & Corbeil, L. B. (1995). A comparative study of bovine and ovine *Haemophilus somnus* isolates. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 59, 173-178.
- Williams, D. J. L., Guy, C. S., Smith, R. F., Guy, F., McGarry, J. W., McKay, J. S. & Trees, A. J. (2003). First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology*, 33, 1059-1065.
- Yaeger, M. J. & Holler, L. D. (2007). Bacterial causes of bovine infertility and abortion. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology* 2. (2nd ed.). (pp. 389-399). St. Louis: Saunders.

Anexo I: Casuística total do estágio curricular.

Tabela 1 – Casuística acompanhada durante o estágio, relativa a bovinos de carne.

Bovinos de Carne	
Situação	Frequência absoluta
Balanopostite	1
Caquexia	10
Casariana	2
Claudicação	5
Clostridiose	2
DAD	1
Desidratação	5
Diarreia neonatal	33
Encefalopatia hepática	2
Eutanásia	2
Fasciolose	5
Ferida	1
Fractura	1
Intoxicação por micotoxinas	1
Intoxicação por taninos	3
Leptospirose	6
Mamite	1
Metrite	1
Míase	4
Necrópsia	11
Papilomatose	1
Parto distócico	18
Patologia respiratória	35
Peritonite	1
Poliartrite	3
Prolapso rectal	3
Prolapso uterino	9
Prolapso vaginal	2
Queratoconjuntivite	40
Retenção placentária	1
Vaca caída	6
Vaginoplastia	1
Vitelos com ataxia	4

DAD: Deslocamento do Abomaso à Direita.

Tabela 2 – Casuística acompanhada durante o estágio, relativa a bovinos de leite.

Bovinos de Leite	
Situação	Frequência absoluta
Carbúnculo sintomático	1
Cesariana	1
Cetose	9
Cirurgia do ceco	1
Cirurgia intestinal	1
Claudicação	4
DAD	1
DAE	10
Diarreia neonatal	12
Eutanásia	3
Fetotomia	2
Fígado gordo	4
Laceração da veia do leite	1
Laceração Teto	1
Mamite	8
Metrite	17
Necrópsia	3
Parto distócico	9
Patologia respiratória	25
Prolapso vaginal	1
Queratoconjuntivite	20
Retenção placentária	6
Torção Uterina	3
DAD: Deslocamento do Abomaso à Direita.	
DAE: Deslocamento do Abomaso à Esquerda.	

Tabela 3 – Casuística acompanhada durante o estágio, relativa a bovinos de raça brava.

Bovinos Raça Brava	
Situação	Frequência absoluta
Caquexia	3
Castração	10
Clostridiose	2
Ferida	3
Fractura	1
Míase	1
Patologia respiratória	1

Tabela 4 – Casuística acompanhada durante o estágio, relativa a pequenos ruminantes.

Pequenos Ruminantes	
Situação	Frequência absoluta
Ectima contagioso	12
Patologia respiratória	14
Feridas	3
Estrogenismo	1
Colibacilose	15
Parto distócico	8
Prolapso vaginal	1
Eutanásia	4
Retenção placentária	1
Caquexia	4
Clostridiose	7
Prolapso rectal	4
Prolapso uterino	4
Mamite	2
Amputação	1
Hérnia inguinal	1

Tabela 5 – Casuística acompanhada durante o estágio, relativa a suínos.

Suínos	
Situação	Frequência absoluta
Castração	3
Malrubro	3
Míase	1

Tabela 6 – Casuística acompanhada durante o estágio, relativa a equinos.

Equinos	
Situação	Frequência absoluta
Castração	2
Cólica	3
Desidratação	1
Ferida	5
Lesão ocular	1
Patologia respiratória	5

Tabela 7 – Casuística acompanhada durante o estágio, relativa a pequenos animais.

Pequenos Animais	
Situação	Frequência absoluta
Parvovirose	1
Eutanásia	1
Dermatite	1
Patologia respiratória	4
Ferida	2
Castração	1